

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie & Chemie  
(Fachgebiet Biologie)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

# Etablierung reiner Endothelzellkultur aus sich differenzierenden embryonalen Stammzellen

vorgelegt von  
Sven Becker

Gießen, 23. August 2011

Meiner Frau, meinen Kindern und meinen Eltern gewidmet.

Diese Arbeit wurde am Physiologischen Institut, Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und am Max-Planck-Institut für Herz und Lungenforschung in Bad-Nauheim durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters

Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Clauss  
Institut für Tierphysiologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sauer  
Physiologisches Institut  
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Endotheliale Dysfunktion . . . . .	1
1.1.1	Rolle endothelialer Vorläuferzellen in Kardiovaskulären Erkrankungen im Hinblick auf mögliche zell-basierte Therapien . . . . .	2
1.2	Embryonale Stammzellen . . . . .	3
1.2.1	Embryonale Stammzellen als Quelle für zell-basierte Therapie . . . . .	5
1.2.2	Murine embryonale Stammzellen . . . . .	5
1.2.3	<i>In vitro</i> Differenzierung der embryonalen Stammzellen . . . . .	8
1.2.4	Differenzierung von Endothelzellen . . . . .	9
1.3	Gentransfer in ES-Zellen . . . . .	10
1.3.1	Transfektion . . . . .	10
1.3.2	Lentivirale Transduktion . . . . .	11
1.3.3	Promotoren . . . . .	13
1.4	Zielsetzung . . . . .	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Geräte . . . . .	15
2.2	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	16
2.3	Antikörper . . . . .	18
2.4	Enzyme . . . . .	19
2.5	Oligonukleotide . . . . .	20
2.6	Vektoren . . . . .	20
2.7	Medien, Puffer und Lösungen . . . . .	26
2.7.1	Zellkultur . . . . .	26
2.7.2	Bakterienkultur . . . . .	27

---

2.8	Zellen . . . . .	28
2.9	Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
2.9.1	Gentechnische Verfahren . . . . .	29
2.9.2	Herstellung von Vektoren . . . . .	33
2.9.3	Bakterienkultur . . . . .	35
2.10	Zellbiologische Methoden . . . . .	36
2.10.1	Auftauen von Zellen . . . . .	36
2.10.2	Passagieren von Zellen . . . . .	36
2.10.3	Einfrieren von Zellen . . . . .	37
2.10.4	Murine embryonale Fibroblasten . . . . .	37
2.10.4.1	Isolierung von MEF . . . . .	37
2.10.4.2	Mitotische Inaktivierung von MEF . . . . .	38
2.10.5	Embryonale Stammzellkultur . . . . .	38
2.10.5.1	Differenzierung . . . . .	39
2.10.5.2	<i>magnetic beads</i> -Isolierung Flk-1-positiver Zellen . . . . .	39
2.10.5.3	Stabile Transfektion von ES-Zellen . . . . .	40
2.10.5.4	Transduktion von ES-Zellen . . . . .	43
2.10.6	Murine Endothelioma Zellen . . . . .	44
2.10.7	HEK 293T Zellen . . . . .	45
2.10.7.1	Herstellung viraler Partikel . . . . .	45
2.11	Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	45
2.11.1	Immunfluoreszenzfärbung von <i>embryoid bodies</i> . . . . .	45
2.11.2	Immunfluoreszenzfärbung von Zellkulturen . . . . .	46
2.12	Durchflusszytometrie (FACS) . . . . .	46
3	Ergebnisse . . . . .	48
3.1	Differenzierung von ES-Zellen . . . . .	48
3.1.1	Analyse der Differenzierung . . . . .	48
3.1.2	Isolation Flk-1 positiver Zellen mit Hilfe von <i>magnetic beads</i> . . . . .	51
3.2	Gentechnische Herangehensweise . . . . .	53
3.2.1	Herstellung notwendiger Vektoren . . . . .	53
3.2.2	Transfektion . . . . .	53
3.2.3	Transduktion . . . . .	58

---

4	Diskussion	63
4.1	Embryonale Stammzellkultur . . . . .	64
4.2	Differenzierung . . . . .	64
4.3	Isolation von Zellen . . . . .	66
4.4	Gentechnische Herangehensweise . . . . .	67
4.4.1	Transfektion . . . . .	68
4.4.2	Lentivirale Transduktion von ES-Zellen . . . . .	71
4.5	Ausblick . . . . .	73
	Zusammenfassung	76
	Summary	78
	Literaturverzeichnis	80
	Abbildungsverzeichnis	93
	Abkürzungsverzeichnis	94
	Danksagung	95
	Anhang	96

# 1 Einleitung

## 1.1 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel kleidet die Innenseite der Gefäßwand aus (sog. Intima) und bildet eine Einzelschicht aus  $1 \times 10^{13}$  Zellen. Es ist für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion von essentieller Bedeutung. Das Endothel moduliert den aktuellen und bedarfsgerechten Gefäßtonus, die antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, die Architektur der Gefäßwand und die Gefäßpermeabilität (Sumpio et al. 2002).

Störungen dieser wesentlichen Endothelfunktionen werden unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst (Kelm und Strauer 1999). Es wurde bewiesen, dass Verletzung und deregulierte Stimulation und Reaktion von Endothelzellen ein Schlüsselereignis in der Pathologie solcher Krankheiten wie Arteriosklerose und Koronare Herzkrankheit (Heitzer et al. 2001; Bonetti et al. 2003; Libby 2002), Bluthochdruck (Versari et al. 2009), Diabetes (Tabit et al. 2010; Taylor 2001; Wong et al. 2010), kongestive Herzinsuffizienz (Kerem et al. 2010) und pulmonale Hypertonie (Sakao et al. 2009) darstellt.

Die enorme sozioökonomische Bedeutung der kardiovaskulären Erkrankungen ist unbestritten. Als besonders herausfordernd werden die Koronare Herzkrankheit und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) angesehen (Lloyd-Jones et al. 2009). Neuere translationale Forschungsstudien haben bewiesen, dass progressive ischämische Funktionsstörungen und Schaden von Organen durch neue therapeutische Strategien wie die zell-basierte Therapie verhindert und wieder hergestellt werden können. Dieses kann als ein ergänzender Therapieansatz oder sogar ein Ersatz herkömmlicher Therapien wie pharmazeutische Behandlung, perkutane transluminale coronare Angioplastie und chirurgische Revaskularisierung angesehen werden.

Die Pathophysiologie endothelialer Dysfunktion ist komplex und beinhaltet mehrere

Mechanismen. Manche dieser Mechanismen werden jedoch von Faktoren gesteuert, die bei den meisten Krankheiten eine Rolle spielen. Es sind die niedrige biologische Verfügbarkeit von NO (Vasodilator), erhöhter Plasmaspiegel von asymmetrischem Dimethylarginin (ein endogener kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase), oxydativer Exzess, Angiotensin II (Vasokonstriktor), Hyperhomocysteinämie und Diabetes.

### 1.1.1 Rolle endothelialer Vorläuferzellen in Kardiovaskulären Erkrankungen im Hinblick auf mögliche zell-basierte Therapien

Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass zusätzlich zu den proliferativen und migratorischen Fähigkeiten gesunder residenter Endothelzellen, beschädigte Endothelzellen zu ersetzen (Ross et al. 1982), auch endotheliale Vorläuferzellen ihren Beitrag zur Erneuerung geschädigter Endothelzellen und Aufrechterhaltung vaskulärer Homöostase leisten (Quirici et al. 2001; Miraglia et al. 1997). Zum ersten Mal wurden die zirkulierenden Zellen von Asahara et al. 1997 isoliert und als CD34-positive, aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen beschrieben, welche die Fähigkeit besitzen, sich *in vitro* zu reifen Endothelzellen zu entwickeln und *in vivo* zur Angiogenese beizutragen. Diese heterogene Zellpopulation bestand aus Zellen, die CD34 und VEGFR-2 exprimierten. Shi et al. 1998 zeigten später, dass auch das Blut eine Population CD34-positiver Zellen beherbergte, die *in vitro* zum Entstehen von Endothelzellen führte. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass neben dem konventionellen Verständnis der Angiogenese die zirkulierenden Zellen im adulten peripheren Blut auch zur Neovaskularisierung beitragen könnten. Diese Zellen wurden später als aus dem Knochenmark stammende im peripheren Blut zirkulierende Zellen beschrieben, die an ischämischen Orten oder in wachsenden Tumoren ihren Platz finden (Rafii und Lyden 2003; Urbich und Dimmeler 2004). Das Feld der zell-basierten Transplantation ist in den letzten Jahren stark gewachsen und ist auf dem Weg, in naher Zukunft eine etablierte Therapiemöglichkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen zu werden. Zell-basierte, Angiogenese und Myogenese fördernde Therapien haben bereits weltweit in Form von klinischen Studien unter Einbeziehung von Patienten mit Herzinsuffizienz und pAVK Katheterisierungslabors erreicht (Kawamoto und Asahara 2007). Trotz der in dem Feld erreichten Fortschritte bleibt eins der noch nicht gelösten Probleme, die schwierige und akkurate Definierung der Vorläuferzellen, ihre Herkunft und Funktion während der Wiederherstellung der Gefäße (Ingram et al. 2005). Des

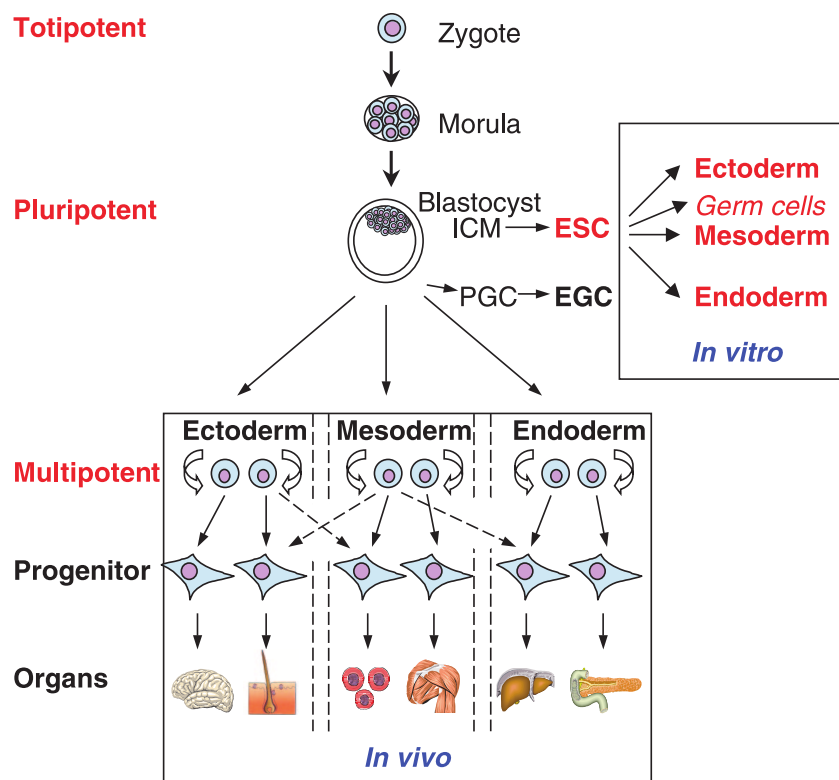


Weiteren enthält das periphere Blut nur einen geringen Anteil an Vorläuferzellen (Kalka et al. 2000) und die Gewinnung von Knochenmark beruht auf aufwendigen, invasiven Methoden. Die Anzahl und Funktion zirkulierender Vorläuferzellen hängt negativ mit dem Krankheitsverlauf in Patienten mit koronarer Herzkrankheit und progressiver kongestiver Herzinsuffizienz zusammen (Werner et al. 2005; Boilson et al. 2008; Valgimigli et al. 2004; Geft et al. 2008).

## 1.2 Embryonale Stammzellen

Die Stammzelle ist der Ursprung des Lebens. Die ultimative Stammzelle ist die befruchtete Eizelle, aus der ein gesamter Organismus entstehen kann. Mit ihr wird daher der Begriff der Totipotenz in Zusammenhang gebracht. Durch die Teilung dient die Eizelle als der Stamm des Zellentwicklungsbaumes, entlang dessen Zweigen Zellen ihre Fähigkeit zur Entstehung weiterer Zellen beizutragen verlieren, je weiter sie vom Stamm entfernt sind. Während der Entwicklung des Organismus durchlaufen seine Zellen eine Serie von Teilungen und Differenzierungen wobei sie immer weiter ihr Potential verlieren (Abbildung 1.1). Dieser Prozess wird als Determination bezeichnet. Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Zellen, die Anfang der 80er Jahre aus der inneren Zellmasse muriner Blastozysten isoliert wurden (Evans und Kaufman 1981; Martin 1981). ES-Zelllinien werden routinemäßig zunächst durch *in vitro* Kultur von Blastozysten mit anschließender Zerteilung der inneren Zellmasse und Kultivierung der disaggregierten Zellen in Anwesenheit des Zytokins *leukemia inhibitory factor* (LIF) (Smith et al. 1988) oder auf einem Monolayer aus mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs, im folgenden auch als *feeder* bezeichnet), die auch als Quelle von LIF dienen, etabliert. Durch die Zugabe von LIF ins Kulturmedium können die ES-Zellen als permanente und undifferenzierte Zelllinien erhalten werden. Dabei bewahren sie ihre Fähigkeit *in vitro* zu vielen Zelltypen zu differenzieren, nach einer ektopischen Injektion in Mäuse Teratome (Kaufman et al. 1983) zu bilden und nach einer Injektion in Blastozysten zu Chimären beizutragen (Bradley et al. 1984).

Durch das Entfernen von LIF aus dem Kulturmedium fangen die ES-Zellen an, sich zu differenzieren und verlieren ihre Pluripotenz. LIF bindet an ein Rezeptorkomplex, das aus dem LIF-Rezeptor (LIFR) und dem Glykoprotein 130 (gp130) besteht. Durch die



**Abbildung 1.1: Stammzellhierarchie**

Zygote und frühe Teilungsstadien (Blastomere) bis zum Morula-Stadium sind als totipotent definiert, weil aus ihnen ein kompletter Organismus entstehen kann. In der Blastozysten haben nur die Zellen der inneren Zellmasse (ICM) die Kapazität alle drei Keimblätter auszubilden, den Ektoderm, den Mesoderm und den Endoderm. Die multipotenten Stamm- und die Vorläuferzellen existieren in adulten Geweben und ersetzen verletzte und abgestorbene Zellen. Die aus der ICM gewonnene ES-Zellen haben die Fähigkeit *in vitro* zu Zellen aller somatischen Zelllinien zu differenzieren.

(Abbildung aus Wobus und Boheler 2005)

Rezeptorbindung wird der JAK/STAT Signalweg aktiviert, der für die Erhaltung der Pluripotenz muriner ES-Zellen von essentieller Bedeutung ist (Smith 2001a).

Die Fähigkeit ES-Zellen *in vitro* zu kultivieren, so wie die Möglichkeit diese Zellen zu unterschiedlichsten Zelltypen zu differenzieren, weckten ein großes Interesse an der Erforschung der embryonalen Stammzellen als einen möglichen Ersatz für geschädigte Gewebe.

### 1.2.1 Embryonale Stammzellen als Quelle für zell-basierte Therapie

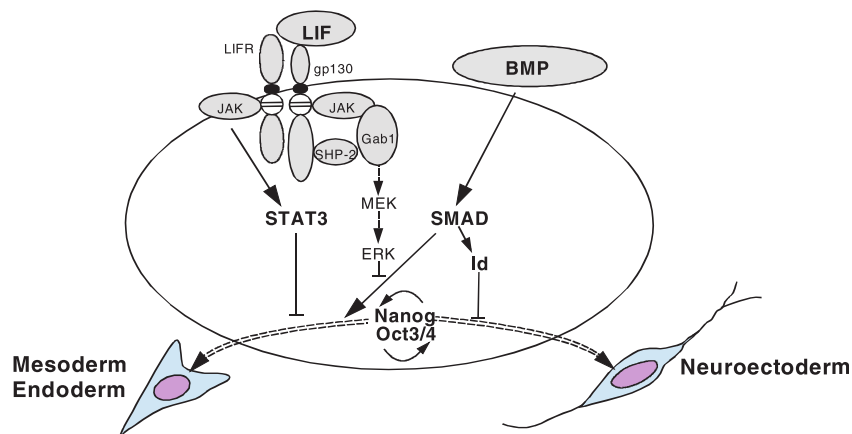
#### Aus embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitete Endothelzellen für die Erforschung von Möglichkeiten zell-basierter Therapien

Vor nicht allzu langer Zeit wurden die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) als vielversprechende Quelle für therapeutische Angiogenese hervorgehoben. ES-Zellen zeichnen sich durch ihr großes regeneratives Potential und ihre Fähigkeit zur multilinealen Differenzierung aus. Sie sind eine ideale Ressource für die regenerative Medizin, in welcher große Anzahl transplanterter Zellen, inklusive der Endothelzellen, benötigt wird (Yamashita et al. 2000). Endothelzellen können, nach der *in vitro* Induktion der Differenzierung in Maus- und Human-ES-Zellen, aus der Fraktion *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)-2-positiver Zellen gewonnen werden (Sone et al. 2007). Aus ES-Zellen abgeleitete Endothelzellen zeigen Expression endothel-spezifischer Marker und sind in der Lage sowohl, *in vitro* als auch *in vivo* Gefäßstrukturen auszubilden (Yurugi-Kobayashi et al. 2003; Yamahara et al. 2008). Demzufolge könnten die ES-Zellen als eine realisierbare neuartige Zellquelle für therapeutische Angiogenese dienen. Aus ethischen Gründen und auf Grund der Immunogenität ist die klinische Anwendung der ES-Zellen jedoch schwierig. Weitere Gefahr besteht darin, dass zusammen mit den differenzierten auch undifferenzierte Zellen transplantiert werden können, was letztendlich zu Tumoren oder Teratoma führen kann. Es gibt jedoch eine Möglichkeit, diese Probleme, zumindest teilweise, zu umgehen und zwar die Generierung von pluripotenten direkt aus adulten somatischen Zellen (Yamanaka 2007). Zurzeit gibt es drei Möglichkeiten, induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) zu erhalten: Zellkerntransfer, Zellfusion und Transduktion von Transkriptionsfaktoren (Yamanaka und Blau 2010).

### 1.2.2 Murine embryonale Stammzellen

Die ersten embryonalen Stammzellen wurden aus den murinen präimplantierten Embryonen in den frühen 80ern isoliert. Die Effizienz dieser Isolierung war von Mäusestamm zu Mäusestamm unterschiedlich und lieferte die besten Ergebnisse bei den Inzuchtstämmen, wie dem 129 Stamm (Schoonjans et al. 2003). Die beim Anfertigen dieser Arbeit verwendete Zelllinie E14Tg2a.4 stammt aus den 129P2/OlaHsd Mäusen. Einst etabliert, zeigten die murinen ES-Zellen eine nahezu unbegrenzte Kapazität, sich *in vitro* zu vermehren

(Smith 2001b) und behielten dabei die Fähigkeit, sich zu allen Zelltypen zu differenzieren. Wie bereits erwähnt, benötigen murine ES-Zellen für ihre Isolierung und die Aufrechterhaltung ihrer Pluripotenz LIF oder MEFs. Darüber hinaus erforderte die Isolation, sowie die Kultivierung der ES-Zellen den Einsatz von fötalem Kälberserum (FCS) (Wiles und Johansson 1999). Versuche, die embryonalen Stammzellen unter serum- und *feeder*-freien Bedingungen zu kultivieren, haben gezeigt, dass LIF alleine für das Verhindern der Differenzierung unzureichend ist. Dies führte zu der Annahme, dass durch MEFs produzierte oder sich im Serum befindliche Wachstumsfaktoren zur Selbsterneuerung von ES-Zellen beitragen könnten. Man hat herausgefunden, dass neben LIF durch eine Zugabe von *bone morphogenetic protein 4* (BMP4) auch unter serum- und *feeder*-freien Bedingungen die Differenzierung verhindert und effiziente Vermehrung von ES-Zellen erreicht werden kann (Ying et al. 2003; Qi et al. 2004). Die kritische Rolle von BMP4 ist dabei die Induktion der Expression von *Id* (*inhibitor of differentiation*) Genen über den SMAD Signalweg (Abbildung 1.2). Eine Überexpression der *Id*-Gene ermöglicht die Kultivierung von ES-Zellen unter serumfreien Bedingungen und in Abwesenheit von BMP4 nur durch die Zugabe von LIF (Ying et al. 2003).



**Abbildung 1.2: Regulation der Selbsterneuerung in murinen ES-Zellen**

Die Proliferation undifferenzierter muriner ES-Zellen wird von Nanog, Oct-3/4 und durch enge Interaktionen zwischen dem LIF-aktivierten JAK/STAT3 Signalweg und BMP-aktivierten *Id* Zielgenen reguliert. Das MEK/ERK Transduktionsmechanismus verhindert das Selbsterneuern und eine ausgewogene Expression von Nanog und Oct-3/4 wirkt einer Differenzierung der ES-Zellen entgegen.

(Abbildung aus Wobus und Boheler 2005)

Für die Festlegung der molekularen Basis der Identität von Stammzellen erwies sich die Identifikation spezifischer Marker als notwendig. Es ist jetzt allgemein anerkannt, dass die murinen ES-Zellen das spezifische Zelloberflächenantigen (*stage-specific mouse embryonic antigen*, SSEA-1) (Solter und Knowles 1978) und den membrangebundenen Rezeptor gp130 (Burdon et al. 1999) exprimieren, sowie eine Enzymaktivität für die Alkaline Phosphatase (Wobus et al. 1984) und Telomerase (Armstrong et al. 2000) besitzen. Die ES-Zellen enthalten ebenfalls den Transkriptionsfaktor Oct-3/4 (Schöler et al. 1989; Pesce et al. 1999), dessen Expression sonst auf das Epiblast und Keimzellen begrenzt ist. Die Expression dieses Faktors *in vivo* ist essentiell für die anfängliche Entwicklung des Potentials der inneren Zellmasse für ihre Pluripotenz (Nichols et al. 1998). In den ES-Zellen ist die beständige und in ihrem Ausmaß angemessene Aktivität von Oct-3/4 notwendig für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz. Eine erhöhte Expression dieses Faktors löst eine Differenzierung in Richtung Endoderm und Mesoderm aus, der Verlust der Oct-3/4 Expression induziert die Bildung von Trophektoderm, die Pluripotenz geht dabei bei beiden Vorgängen verloren (Niwa et al. 2000). Einige Zeit später wurde Nanog als ein weiterer Faktor entdeckt, der eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Pluripotenz spielt (Mitsui et al. 2003). Eine Überexpression von Nanog ermöglicht eine fortwährende Kultivierung von ES-Zellen in Abwesenheit jeglicher gp130 Stimulation, ohne dass die Zellen ihre Pluripotenz verlieren (Chambers et al. 2003). Nanog könnte daher das Differenzierung induzierende Potential von Oct-3/4 regulieren (Abbildung 1.2). Zwei weitere Signalwege, MEK/ERK und Wnt, sind an der Regulierung der Pluripotenz von ES-Zellen beteiligt, wobei die Inhibierung der MEK/ERK Transduktion durch eine Blockade von MEK die Differenzierung der Zellen unterbindet. Eine Inhibierung der an der Wnt-Transduktion beteiligten *glycogen syntase kinase-3* (GSK-3) resultiert in der Proliferation und Selbsterneuerung der ES-Zellen (Li und Ding 2010; Ying et al. 2008; Silva et al. 2008). Über die Wechselwirkungen zwischen den Signalwegen und den Transkriptionsfaktoren Nanog und Oct-3/4 ist jedoch bis dato wenig bekannt und es bleibt an dieser Stelle nur noch zu sagen, dass die Regulation der Pluripotenz und Differenzierung in ES-Zellen ein hochdynamischer Prozess ist, an dem viele interaktive Faktoren beteiligt sind.

### 1.2.3 *In vitro* Differenzierung der embryonalen Stammzellen

Während der Maus-Embryogenese werden im Epiblast aus dem primitiven Ektoderm das Ectoderm, Mesoderm und das definitive Endoderm gebildet. Aus diesen drei Keimblättern entstehen unter ständiger Wechselwirkung alle Gewebearten und Organe im sich entwickelnden Embryo. Das *in vitro* Differenzierungspotential muriner ES-Zellen hat die Erforschung dieser Prozesse enorm vorangetrieben (Wobus und Boheler 2005).

Die Differenzierung muriner ES-Zellen kann durch mehrere Methoden eingeleitet werden. Das Entfernen von *feeder* und LIF aus einer adherenten ES-Zellkultur resultiert in einer Herunterregulation der Oct4-Expression und Entstehung heterogener Zellpopulationen, die sich in ihrer Morphologie von den ES-Zellen unterscheiden (Smith 1991). Diese Populationen scheinen jedoch nur eine geringe Anzahl an unterschiedlichen Zelltypen zu umfassen und bestehen zumeist aus Fibroblasten-ähnlichen Zellen und Zellen mit der Charakteristik des embryonalen Endoderms. Die Differenzierung in diesem System ist unvollständig und nach längerem Kultivieren erscheinen in der Kultur Areale aus pluripotenten Zellen, die möglicherweise durch, von differenzierten Zellen produziertes, LIF aufrechterhalten werden (Rathjen et al. 1990). Die Adhäsionskultur von ES-Zellen bietet besser definierte Bedingungen, erfordert jedoch den Einsatz teurer Wachstum und Differenzierung unterstützender Substrate und Zytokine. Weitere Differenzierungsmethoden basieren auf der Kultivierung von ES-Zellaggregaten (**embryoid bodies**, EBs, Abbildung 2.10) ebenfalls in Abwesenheit von LIF und *feeder* in hängenden Tropfen (Boheler et al. 2002; Wobus et al. 2002), in Suspensionskultur (Doetschman et al. 1985) oder in Methylzellulose (Wiles und Keller 1991). Dank der dreidimensionalen Form der EBs lassen sich die im früheren Embryo stattfindenden Vorgänge besser nachahmen und verfolgen. Bei der Anfertigung dieser Arbeit wurde die Suspensionsmethode angewendet, da sie, wegen ihrer Skalierbarkeit, besser dem verfolgten Ziel, große Mengen an Endothelzellen herzustellen, entsprach.

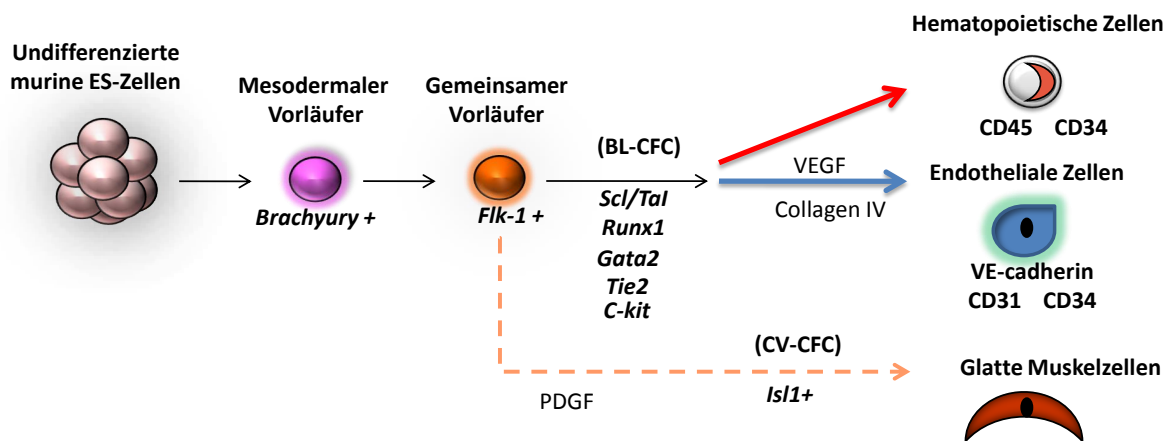
Die Möglichkeiten pluripotente Zellen während ihrer Differenzierung in bestimmte Richtungen zu lenken und die Viabilität, sowie die Reifung von individuellen Phänotypen *in vitro* zu unterstützen, sind gegenwärtig limitiert. Die Folge davon ist eine Mischung aus verschiedenen Zelltypen. Auf Grund der fehlenden Einsicht in die Möglichkeiten die Differenzierung embryonaler Stammzellen in die Richtung einer bestimmten Linie zu lenken, bleibt als Alternative, lediglich die gewünschten Zelltypen aus diesem Mix zu

isolieren.

### 1.2.4 Differenzierung von Endothelzellen

Blut- und Endothelzellen sind unter den ersten Zelltypen mesodermalen Ursprungs, die während der embryonalen Entwicklung entstehen. Hämatopoetische Zellen und Blutgefäße stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab, der als Hämangioblast bezeichnet wird (Keller 2005). Der Beweis für den gemeinsamen Ursprung der endothelialen und hämatopoetischen Zellen wurde durch die Identifikation von *blast colony-forming cell* (BL-CFC), die aus murinen EBs und später aus Embryonen isoliert wurden, erbracht (Choi et al. 1998; Kennedy et al. 1997; Nishikawa et al. 1998). Die BL-CFCs können daher zur Entstehung sowohl primitiver und definitiver hämatopoetischer als auch endothelialer Vorläufer beitragen (Abbildung 1.3). Des Weiteren können aus ihnen glatte Muskelzellen entstehen (Ema et al. 2003). Darüber hinaus haben Zellabstammungsexperimente gezeigt, dass kardiale Abstammungslinien, Endokard und Myokard aus der intermediären, Flk-1 exprimierenden Zellpopulation entstehen (Motoike et al. 2003; Ema et al. 2006).

Für die Induzierung der Flk-1 Expression in differenzierenden mES-Zellen eignet sich



**Abbildung 1.3: Entwicklungsmodell muriner mesodermaler Zellen**

Ein Teil der Brachyury-positiven, Flk-1 exprimierenden Zellen entsteht während der mesodermalen Spezifikation von differenzierenden murinen ES-Zellen. Diese Flk-1 positive Zellen sind in der Lage BL-CFCs zu bilden, die sich im weiteren Verlauf zu hämatopoetischen, endothelialen als auch zu glatten Muskelzellen entwickeln können. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass BL-CFC das *in vitro* Äquivalent des Hämangioblasten darstellt. (Abbildung modifiziert nach Jezierski et al. 2007)

die Suspensionskultur zur Herstellung großer Mengen an EBs am besten (Dang et al. 2004). Während der Embryogenese beginnen die hämatopoietischen sowie angiogenetischen Prozesse, wenn die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen durch die zunehmende Größe des Embryos limitiert wird (Semenza 1999). Auf Grund der im Inneren der EBs vorherrschenden hypoxischen Bedingungen kommt es, analog zu den im sich entwickelnden Embryo ablaufenden Prozessen, zur Ausschüttung pro-angiogener Faktoren, und spontaner Entstehung von Zellen hämatopoietischer Abstammungslinie. Daher bietet die Suspensionskultur die Möglichkeit, eine sehr große Anzahl an Zellen auf engem Raum zu produzieren und macht den Einsatz teurer Chemikalien wie Collagen IV und VEGF überflüssig.

## 1.3 Gentransfer in ES-Zellen

Die Fähigkeit der ES-Zellen sich klonal zu vermehren, ermöglicht die Identifikation und Separation einzelner, stabil transfizierter Klone. ES wurden daher bereits mehrere Verfahren des Gentransfers entwickelt. Die DNA wird unter anderem durch Infektion, Transfektion mit Hilfe geeigneter Reagenzien (Kobayashi et al. 2005) und Elektroporation (Tompers und Labosky 2004) in ES-Zellen eingebracht. Durch die retrovirale Transduktion wird das Transgen stabil in das Wirtsgenom integriert, durch Transfektion kann sowohl eine transiente als auch eine stabile Expression der eingebrachten Gene erreicht werden.

Wegen der besonderen Eignung für genetische Modifikationen haben sich die ES-Zellen als ein leistungsfähiges Instrument für die Erforschung der Genfunktionen erwiesen. Genmanipulationen halfen beim Herausfinden von Faktoren, die für Pluripotenz in embryonalen Stammzellen verantwortlich sind (Niwa et al. 2000; Mitsui et al. 2003). Mit wachsender Anzahl identifizierter, Zellabstammungslinien spezifischer Gene, steigen die Möglichkeiten, aktiv in die Differenzierung von ES-Zellen einzugreifen, oder die Differenzierungsprozesse durch Expression von Reportergenen unter der Kontrolle spezifischer Promotoren zu beobachten (Conley et al. 2004).

### 1.3.1 Transfektion

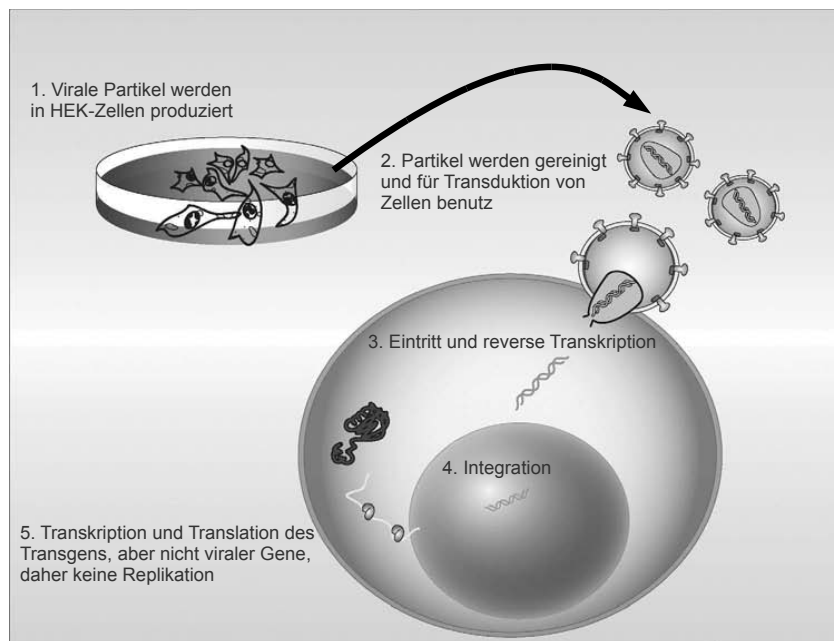
ES-Zellen können sowohl durch chemische (Lipofektion) als auch physikalische (Elektroporation) Methoden transfiziert werden. Die wohl günstigste aber auch am wenigsten effizi-



ente chemische Methode ist dabei die Transfektion durch Calcium-Phosphat-Präzipitation. Durch die Nutzung von kationischen Lipiden werden höhere Effizienzen erreicht. Bei der Anfertigung dieser Arbeit wurde jedoch auf Elektroporation gesetzt. Die Zellmembran wird dabei durch Spannungspulse für DNA permeabel gemacht. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, das gerade die elektrische Kapazität der Zellmembran übersteigt, können in der Membran Poren erzeugt werden, ohne dass die Zellen dabei zerstört werden. Dadurch können Moleküle ins Zellinnere diffundieren (Conley et al. 2004). Während für transiente Expression ringförmige Plasmid-DNA verwendet wird, sollte der Vektor für die Erhöhung der Effizienz stabiler Integration linearisiert werden. Da die Elektroporation bei relativ niedriger Effizienz relativ hohe Zytotoxizität aufweist, sollte bei dieser Methode von einer hohen Zellzahl ausgegangen werden. Die Isolierung stabil transfizierter Klone nach der Transfektion erfordert eine Antibiotikaselektion. Die Vektoren enthalten daher ein entsprechendes, von einem konstitutiven Promoter kontrolliertes Resistenzgen.

### 1.3.2 Lentivirale Transduktion

Lentiviren gehören zu der großen Familie der Retroviren (Goff 2007). Sie werden für gentechnische Anwendungen, in modifizierter Form und als lentivirale Vektoren bezeichnet, verwendet. Ihre Fähigkeit lange Transgensequenzen zu tragen (bis zu 9 kb), nur minimale Immunreaktion auszulösen und nicht-proliferierende Zellen zu infizieren, macht ihre Verwendung für den Gentransfer besonders interessant (Felder III und Sutton 2009). Lentiviren, wie auch alle anderen Retroviren, stellen eine RNA enthaltende Hülle dar, die mit der Zellmembran verschmilzt und den viralen Core im Inneren der Wirtszellen positioniert. Innerhalb der Zellen wird die RNA von den Core Proteinen in doppelsträngige DNA revers-transkribiert und ins Wirtsgenom integriert (Abbildung 1.4). Lentivirale Vektoren unterscheiden sich von den Lentiviren, in dem sie typischerweise ein bestimmtes Gen in die Zelle einbringen, wobei die viralen Komponenten nicht repliziert werden. Während die Viren sich autonom vermehren und sich selbständig innerhalb und unter den Zellen ausbreiten, werden die Vektoren im Labor unter Verwendung einer Zellkultur generiert. Dabei werden spezifische, zuvor bestimmte, virale und transgene Komponenten zusammengesetzt. Anschließend werden die generierten viralen Partikel isoliert und für die Transduktion bestimmter Zellen verwendet (Felder III und Sutton 2009). Die Entwicklung lentiviraler Vektoren wurde von zwei Faktoren bedingt: die Sicherheit (Replikations-



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Lebenszyklus eines lentiviralen Vektors**

Ein lentiviraler Vektor wird für Transduktion von Zellen im Labor hergestellt und kann sich wegen der Replikationsdefizienz nicht vermehren.

(Abbildung modifiziert nach Felder III und Sutton 2009)

defizienz) und Optimierung (höhere Effizienz). Es stellte sich heraus, dass die beiden Faktoren sich perfekt ergänzten. Durch das Entfernen von *trans*-regulatorischen HIV Elementen (Gag, Pol, Env) wurde Platz für das Transgen geschaffen. Ein Transfervektor wurde generiert, der nur aus notwendigen *cis*-regulatorischen Sequenzen und einem sich unter der Kontrolle eines internen Promoters befindenden Resistenzgen bestand (Poznansky et al. 1991). Alle für die Verpackung notwendigen Proteine wurden dabei in *trans* durch eine Cotransfektion bereitgestellt. Dabei reduzierte sich die Generierung replikationskompetenter Viren auf ein nicht erfassbares Minimum. Ein entscheidender Durchbruch wurde erzielt, als gezeigt wurde, dass unter Verwendung des *vesicular stomatitis virus-glucoprotein* (VSV-G) als Hüllprotein pseudotypisierte HIV Partikel mit hohem Titer und sehr breitem Tropismus hergestellt werden können (Naldini et al. 1996b). Ein weiterer Schritt in Richtung Sicherheit wurde durch die Entwicklung von *self inactivating* (SIN) Vektoren, durch das Entfernen der U3 Sequenz aus dem 3' *long terminal repeat* (LTR), getan (Reicin et al. 1995). Es wurde schon bald darauf festgestellt, dass neben

der verbesserten Biosicherheit die SIN-Vektoren durch die Inaktivierung des LTR, der eine Promoterfunktion inne hat, die Promoterinterferenz reduziert wurde (Miyoshi et al. 1998). Die Anpassung und erfolgreiche Nutzung von SIN Konstrukten ist aus dem Standpunkt der Biosicherheit mit Abstand die wichtigste Errungenschaft der Entwicklung von Transfervektoren.

### 1.3.3 Promotoren

#### Flk-1 Promoter

*Vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2, auch Flk-1) ist die erste Rezeptor-Tyrosinkinase, die in Angioblast-Vorläufern exprimiert wird. Ihre Funktion ist essentiell für die Differenzierung der Endothelzellen und hämatopoietischer Vorläufer (Kappel et al. 1999). VEGF und Flk-1 repräsentieren den als erstes während der Vasculogenese aktivierten endothelzell-spezifischen Signaltransduktionsweg. Des Weiteren wurde durch Gen-Targeting Studien aufgezeigt, dass die Funktion des Flk-1 Gens für die Differenzierung endothelialer sowie hämatopoietischer Vorläufer unerlässlich ist (Shalaby et al. 1995; Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996).

Durch die Promoteranalyse wurde gezeigt, dass die das Flk-1 Gen 5' flankierende Region eine zell-spezifische Expression in transfizierten Endothelzellen ermöglicht (Patterson et al. 1995; Röncke et al. 1996). Dabei wurde festgestellt, dass die Flk-Promotersequenz bis -4,1 kb vor dem Transkriptionsstart zwar eine schwächere Aktivität aufweist, jedoch die höchste Zelltyp Spezifität zeigt. Durch *in vivo*-Experimente konnte aber bei keiner der untersuchten Promoterregionen eine reproduzierbare endothelium-spezifische Reporterexpression nachgewiesen werden. Kappel et al. 1999 fanden eine weitere, autonome regulatorische Sequenz auf dem zweiten Intron des Flk1 Gens. Ihre Untersuchungen haben gezeigt, dass ein 939 pb langes Fragment zwischen -640 bp und +299 bp in Verbindung mit einer 510 bp langen Enhancer-Sequenz, die sich zwischen +3437 bp und +3947 bp auf dem zweiten Intron befindet, für eine spezifische Expression ausreichen ist.

#### VE-Cadherin Promoter

VE-Cadherin gehört zu der Cadherin-Familie von adhesiven Rezeptoren (Takeichi 1995), es befindet vor allem an den interendothelialen Verbindungsstellen, wo es in dem endo-

thelialen Verband eine wichtige Rolle spielt. Dieses Protein wird exklusiv und konstitutiv vom Endothel aller Blutgefäße exprimiert (Breier et al. 1996). Darüber hinaus wird VE-Cadherin in endothelialen Vorläufern schon am 7,5 embryonalen Tag im Maus Embryo exprimiert.

Der VE-Cadherin Promoter wurde von Gory et al. 1999 analysiert. Aus den verschiedenen Längen der analysierten Promoterregion wurde bei dieser Arbeit ein Fragment zwischen -2486 pb und +64 bp verwendet. Er zeigte bei einer handelbaren Größe und durchschnittlicher Aktivität die höchste Spezifität. Darüber hinaus wurde bei dieser Promotorregion keine Expression des Reportergens in zwei hämatopoietischen Zelllinien beobachten.

## 1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit diene der Etablierung einer Methode für die Isolierung einer für Zell-Transplantationstudien ausreichenden Menge von Endothelzellen aus sich differenzierenden murinen embryonalen Stammzellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Durchlichtmikroskop DMIL	Leica
Bakterien-Schüttler (Innova 44)	New Brunswick Scientific
Elektrophoresesystem	PeqLab
Elektroporator Gene Pulser Xcell	Bio-rad
FACScalibur	BD Bioscience
Feinwaage	Denver instruments
Geldokumentation	Intas
Heizblock	HLC
Heizschrank	Heraeus
High End Fluoreszenz Mikroskop Imager Z.1	Zeiss
Konfokalmikroskop	Zeiss
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific
Mikrowelle	Sharp
Neubauerzählkammer	Marienfeld
PCR Maschine	Biometra/Eppendorf
Photometer (Nanodrop)	Peqlab
Photometer (SmartSpec Plus)	Bio-rad
Protein A/G PLUS	Santa Cruz

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Sezierbesteck	F. S. T. Fine Science Tools
Sterilbank	Nuaire
Vakuumpumpe	KNF Lab
VersaDoc Imaging System	Bio-rad
Waage	AND
Wasserbad	Microm
Western Blot Apparatur Mini Proean tetra cell)	Bio-rad
Z1 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Zellkulturinkubatoren	Nuaire

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

### Allgemeine Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Roth
Agarose (low melt)	USB Corporation
$\beta$ -Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Serva
DNA Gelladepuffer Roti®-Load DNA	Roth
Ethanol (EtOH)	Roth
Ethidium Bromid (EthBr)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
Glycerin 99,5 % p.A.	Roth
HEPES	PAA
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth

weiter auf der nächsten Seite

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Methanol	Roth
Mowiol	
n-Butanol	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Paraformaldehyd	
TRIS	Roth
Triton X 100	Roth
Tween 20	Sigma Aldrich

## In der Zellkultur verwendete Medien und Lösungen

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Collagenase B	Roche
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose (DMEM)	Gibco
DNaseI aus Rinderpankreas	Roche
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
Gelatine, porcine	Sigma
Geneticin (G418)-Lösung	Roth
Hygromycin	Sigma
Iscove's Flüssigmedium mit stabilem Glutamin (IMDM)	Biochrom AG
Leukemia inhibitory factor (LIF) (ESGRO®)	Millipore
Mitomycin C	Sigma

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA
Opti-MEM	Gibco
PBS Ca & Mg frei	PAA
Penizillin/Streptomycin (Pen/Str)	PAA
Polybrene (Hexadimethrin Bromid)	Millipore
Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (polyHEMA)	Sigma
Sodium Pyruvate (Pyruvat)	PAA
Trypsin-EDTA	Gibco
Zeocin	Invitrogen

## 2.3 Antikörper

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
anti- $\alpha$ SMA Clone 1A4	AbD serotec
CD31 rat anti mouse	BD
copGFP	Evrogen
Dynabeads M280 Sheep anti-Rabbit IgG	Invitrogen
FLK1 rat anti mouse	BD
Rat IgG2a, $\kappa$ Isotype control	BD
VE-Cadherin rat anti mouse	BD

Des Weiteren wurden entsprechende, mit Alexa Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte sekundär Antikörper verwendet.



## 2.4 Enzyme

### Restriktionsendonukleasen

<i>Name</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
BamHI	<code>g gatcc</code>
BshTI	<code>a ccggt</code>
BspTI	<code>c ttaag</code>
Clal	<code>at cgat</code>
Eam1105I	<code>gacn nnnngtc</code>
EcoRI	<code>g aatc</code>
EcoRV	<code>gat atc</code>
HindIII	<code>a agctt</code>
MluI	<code>a cgcgt</code>
NcoI	<code>c catgg</code>
NdeI	<code>ca tatg</code>
NheI	<code>g ctagc</code>
NotI	<code>gc ggccgc</code>
Pfl23II	<code>c gtacg</code>
PstI	<code>ctgca g</code>
SacI	<code>gagct c</code>
SacII	<code>ccgc gg</code>
Sall	<code>g tcgac</code>
SmaI	<code>ccc ggg</code>
XbaI	<code>t ctaga</code>
XhoI	<code>c tcgag</code>

## Enzyme für die Klonierung

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
MangoMix	Bioline
Pfu Polymerase	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas
T4 Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	Fermentas
Taq Polymerase	Bioline

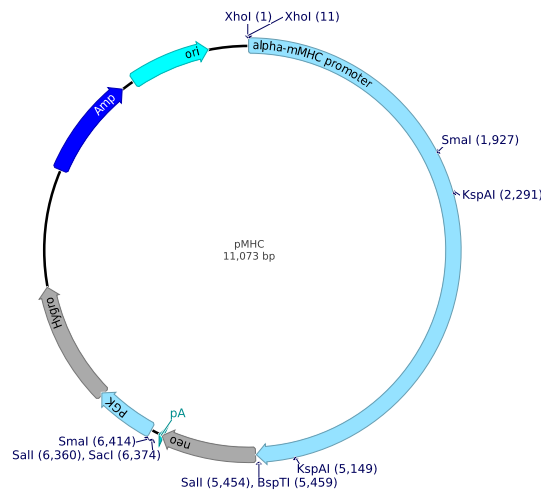
## 2.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide befinden sich im Anhang.

## 2.6 Vektoren

Der Ausgangsvektor pMHC (Abbildung 2.1) wurde freundlicherweise von Stefanie Bachmann (Abteilung I, Max-Planck-Institut in Bad-Nauheim) zur Verfügung gestellt. Dieser stammt von einem Vektor ab, der in der GenBank unter der Nummer AY491501.1 geführt wird, mit dem Unterschied, dass der zur Verfügung gestellte Vektor anstatt des humanen *beta-myosin heavy chain*-Promoters den *alpha-murine myosin heavy chain* ( $\alpha$ -mMHC)-Promoter enthielt. Neben dem Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines spezifischen Promoters enthielt dieses Plasmid ein Hygromycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des konstitutiven Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promoters. Das Hygromycin-Resistenzgen diente der Antibiotika-Selektion der stabil transfizierten ES-Zellklone.

pFlk (Abbildung 2.2) diente der Etablierung einer ES-Zelllinie. Der Vektor enthielt einen endothelzell-spezifischen Promoter Flk-1, der die Expression einer bicistronischen Kasette, bestehend aus einem Neomycin-Resistenzgen, einer *internal ribosome entry site* (IRES)-Sequenz (Jang et al. 1990; Jackson et al. 1990), sowie einem Reportergen (EGFP), kontrollierte. Des Weiteren befand sich im Vektor eine Flk-Enhancer Sequenz, die die Spezifität des Promoters sicherstellte (Kappel et al. 1999). Die Verwendung der etablierten Zelllinie sollte eine Antibiotika-Selektion während der Differenzierung der ES-Zellen spontan entstehender, Flk-1-positiver Zellen ermöglichen.



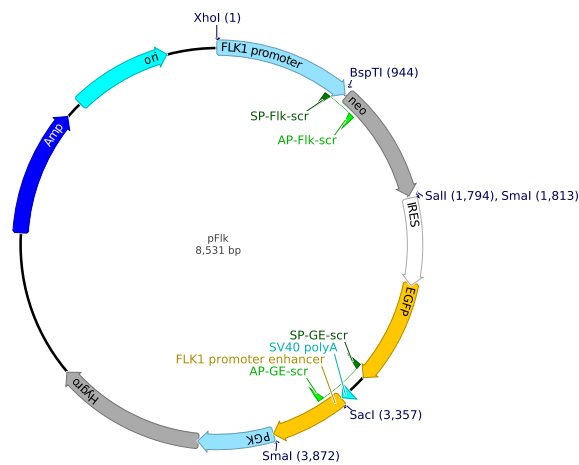
**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Vektors pMHC**

Ausgangsvektor für die Klonierung spezifischer nicht-viraler Vektoren.

Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, alpha-mMHC = alpha-murine myosin heavy chain, neo = Neomycinresistenz, pA = Polyadenylierungssignal, PGK = Phosphoglyceratkinase-Promoter, Hygro = Hygromycinresistenz

Analog zum pFlk Vektor diente pVE-Cad (Abbildung 2.3) der Etablierung einer weiteren ES-Zelllinie. In diesem Vektor wurde jedoch VE-Cadherin-Promoter (Gory et al. 1999) als ein weiterer endothellzell-spezifischer Promoter verwendet. Der Vektor pcDNA-PGK-EGFP (Abbildung 2.4) wurde hergestellt, um eine ES-Zelllinie zu generieren, die GFP konstitutiv exprimiert. Diese Zelllinie sollte als Positivkontrolle für GFP Expression dienen. Als Ausgangsvektor wurde das Plasmid pcDNA<sup>TM</sup>5/TO (Invitrogen) verwendet. pcDNA-PGK-EGFP enthielt ein EGFP-Gen unter der Kontrolle des PGK-Promoters. Der Antibiotika-Selektion stabil transfizierter ES-Zellklone diente ein Hygromycinresistenz-Gen, dessen Expression durch den Simian-Virus 40 (SV40)-Promoter kontrolliert wurde.

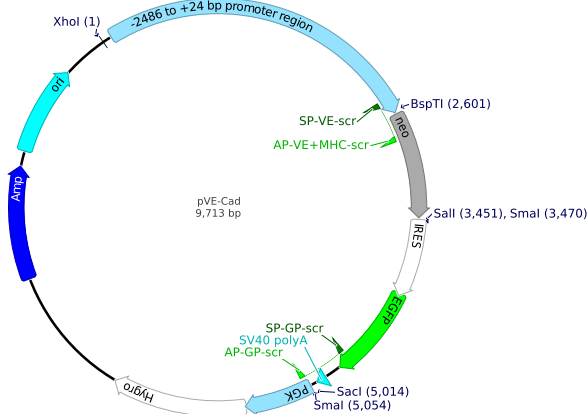
Der pGZ-CMV Vektor (System Biosciences) (Abbildung 2.5) diente als Ausgangsvektor und als Positiv-Kontrolle für die Produktion viraler Partikel und Transduktion. Dieser Vektor, so wie der pGZ-Flk, enthält die Transgen-DNA, die in das Genom der Wirtszelle integriert wird, sie werden daher als Transferplasmide bezeichnet. Bei dem pGZ-CMV handelte es sich um einen lentiviralen *self-inactivating* (SIN)-Vektor, der dem traditionellen HIV-Vektor *backbone* entstammte. Der dem HIV-*backbone* entstammende Teil befand sich zwischen den sogenannten *long terminal repeats* (LTR), dem für die



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Vektors pFlk**

Vektor mit Flk-1 Promoter/Enhancer und der bicistronischen Kasette bestehend aus einem Neomycin-ResistenzGen, einer IRES Sequenz und dem Reportergen EGFP.

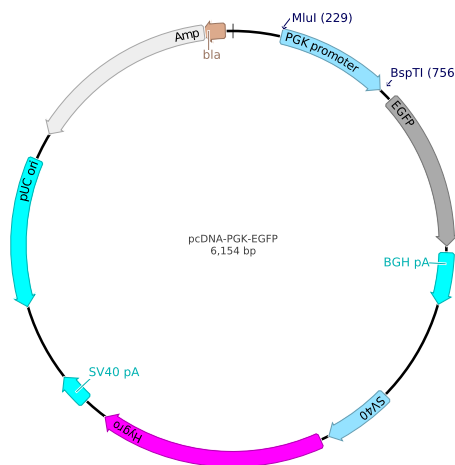
Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, neo = Neomycinresistenz, IRES = *internal ribosome entry site*, EGFP = *enhanced green fluorescent protein*, SV40 polyA = Simian-Virus 40 Polyadenylierungssignal, PGK = Phosphoglyceratkinase-Promoter, Hygro = Hygromycinresistenz



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Vektors pVE-Cad**

Vektor mit VE-Cadherin Promoter und der bicistronischen Kasette bestehend aus einem Neomycinresistenz-Gen, einer IRES Sequenz und dem Reportergen EGFP.

Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, neo = Neomycinresistenz, IRES = *internal ribosome entry site*, EGFP = *enhanced green fluorescent protein*, SV40 polyA = Simian-Virus 40 Polyadenylierungssignal, PGK = Phosphoglyceratkinase-Promoter, Hygro = Hygromycinresistenz



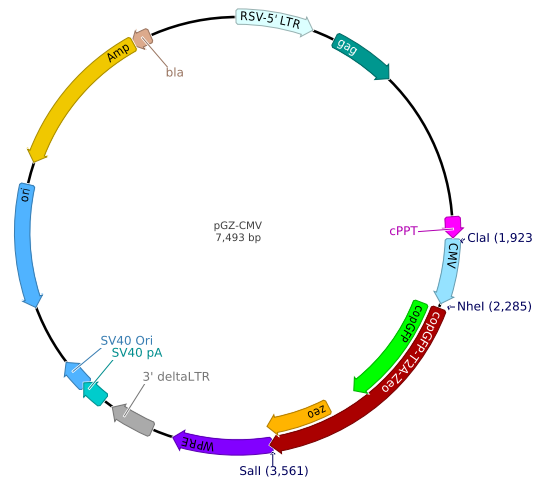
#### Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Vektors pcDNA-PGK-EGFP

Dieser Vektor diente der Erzeugung einer stabil transfizierten ES-Zelllinie, die als positiv Kontrolle für GFP-Expression eingesetzt wurde.

Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, PGK = Phosphoglyceratkinase-Promoter, EGFP = *enhanced green fluorescent protein*, BGH pA = *bovine growth hormone* Polyadenylierungssignal, SV40 = Simian-Virus 40-Promoter, Hygro = Hygromycinresistenz, SV40 pA = Simian-Virus 40 Polyadenylierungssignal

Transkription und Verpackung der viralen RNA verantwortlichen RSV-5' LTR und dem für die reverse Transkription der transduzierten viralen RNA benötigten 3'  $\Delta$ LTR. Zwischen den LTRs befand sich neben lentiviralen Elementen (*gag* - Verpackungssignal, *Rev response element* (RRE), welches *gag*-Protein bindet und bei der Verpackung des viralen Transkripts beteiligt ist und *central porphyrine tract* (cPPT), in die Kerntranslokation und Integration des transduzierten viralen Genoms involviert ist) die Expressionskassette, die aus dem CMV-Promoter, dem GFP-Gen und dem Zeocin-Resistenzgen bestand. Direkt hinter dem Transgen befand sich eine Enhancersquenz - das posttranskriptionale regulatorische Element des *Woodchuck Hepatitis Virus* (WPRE), das zur Steigerung der Transgenexpression eingesetzt wurde (Schwenter et al. 2003). Der Vektor verfügte noch über einen SV40-ori, der die Replikation des Plasmids in Säugerzellen ermöglichte, was für hohe Titer bei der Produktion der pseudoviralen Partikel in HEK-Zellen sorgte.

Der pGZ-Flk Vektor (Abbildung 2.6) wurde aus dem pGZ-CMV abgeleitet, in dem der CMV-Promoter durch den Flk1-Promoter ersetzt und der Flk1-Promoter Enhancer (Kappel et al. 1999) zwischen die Sequenzen des Transgens und WPRE subkloniert wurde.



### Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pGZ-CMV

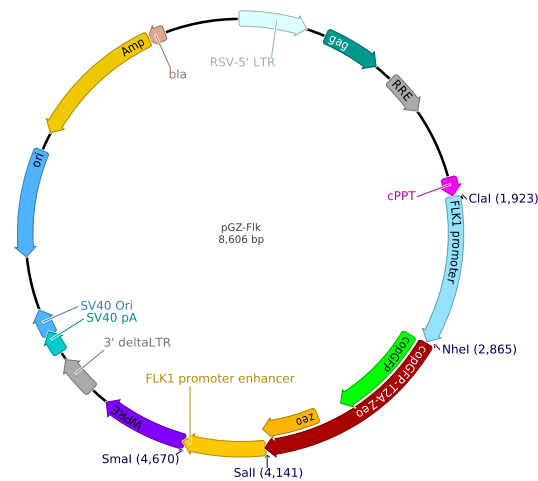
Dieser Vektor diente als Kontrolle und als Ausgangsvektor für die Klonierung spezifischer Vektoren.

RSV-5'LTR = Hybrid aus dem Promoter des Respiratorischen Syncytial Virus und dem R/U5 *long terminal repeat*, gag = Verpackungssignal, RRE = *rev responsive element*, cPPT = *central polypurine tract*, CMV = CMV Promoter, copGFP = GFP aus Copepoden, Zeo = Zeocin-Resistenzgen, WPRE = *posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus*, Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, pA = Polyadenylierungssignal

Für die Produktion viraler Partikel wurden neben den pGZ Vektoren das Hüllplasmid pMD2.G (Abbildung 2.7) und das Verpackungsplasmid psPAX2 (Abbildung 2.8) eingesetzt.

Das Hüllplasmid enthält das Gen für das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus. Die Glykoproteine der Retroviren sind für die Bindung des Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle und die Fusion der viralen mit der zellulären Membran verantwortlich. Die Verwendung von VSV-G ermöglicht die Herstellung viraler Partikel, die in der Lage sind, nahezu alle Zelltypen zu transduzieren.

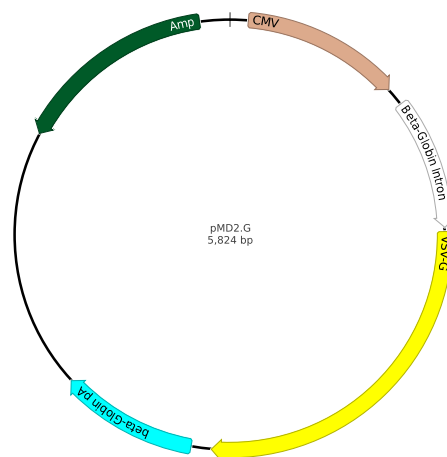
Das Verpackungsplasmid enthält neben den drei großen offenen Leserahmen *gag*, *pol* und *env*, die für die Strukturproteine Gag (gruppenspezifische Antigene) und Env (Hüllglykoproteine) und für die Pol-Enzyme (Polymeraseaktivitäten) kodieren, weitere Gene für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und akzessorischen Proteine Vpr und Vpu.



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pGZ-Flk**

Dieser Vektor wurde über den Austausch des CMV-Promoters durch den Flk-Promoter und Subklonierung dessen Enhancers an der Restriktionsschnittstelle Sall generiert.

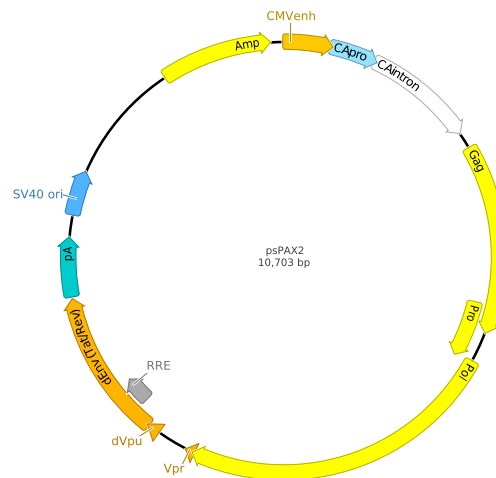
RSV-5'LTR = Hybrid aus dem Promoter des Respiratorischen Syncytial Virus und dem R/U5 long terminal repeat, gag = Verpackungssignal, RRE = *rev responsive element*, cPPT = *central polypurine tract*, copGFP = GFP aus Copepoden, Zeo = Zeocin-Resistenzgen, WPRE = *posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus*, Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, pA = Polyadenylierungssignal



**Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Hüllplasmids pMD2.G**

Dieses Plasmid wurde zur Produktion viraler Partikel in HEK-Zellen eingesetzt

CMV = Promotor/Enhancer des Zytomegalovirus, VSV-G = Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus, pA = Polyadenylierungssignal, Amp = Ampicillinresistenzgen



**Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmids psPAX2**

Dieses Plasmid wurde zur Produktion viraler Partikel in HEK-Zellen eingesetzt  
 CMVenh = Enhancer des Zytomegalovirus, CApro = Chicken beta actin Promotor, CAintron = Chicken beta actin Intron, Gag = group antigen, Pro = Protease, Pol = Polymerase, dEnv = *gvelope*-Proteine inklusive der Gene für Tat und Rev, RRE = reverse responsive element, pA = Polyadenylierungssignal, SV40 ori = simian virus 40 origin, Amp = Ampicillinresistenzgen

## 2.7 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.7.1 Zellkultur

- **Medium für die Kultivierung von ES-Zellen (ES-Medium):**  
 IMDM mit 15% FCS, 1% NEAA, 1% Pen/Str, 1mM Pyruvat, 100  $\mu$ m  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1000 U/ml LIF.  
 IMDM (Iscove's modified DMEM) enthält 25 mM HEPES und ist optimal für eine  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 7%.
- **Differenzierungsmedium:**  
 Wie ES-Medium jedoch ohne LIF
- **Medium für die Kultivierung von Maus-Endothelioma (MEndo) Zellen (MEndo-Medium):**  
 MCDB 131 mit 15% FCS, 50  $\mu$ g/ml L-Glutamin, 50  $\mu$ g/ml ECGS, 100  $\mu$ g/ml Heparin, 1% Pen/Str



- **Medium für die Kultuvierung von Murinen embryonalen Fibroblasten (MEF-Medium):**  
DMEM mit 15% FCS, 1% NEAA, 1% Pen/Str
- **Medium für mitotische Inaktivierung von MEF (Inaktivierungsmedium):**  
DMEM mit 5% FCS, 1% Pen/Str, 1% NEA und 10  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin C
- **Einfriermedium:**  
DMEM mit 50% FCS und 10% DMSO
- **Medium für die Kultuvierung von HEK 293T Zellen:**  
DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep
- **HEPES-Puffer:**  
Dieser Puffer wurde für ES-Zellen verwendet. Für einen 3l Ansatz wurden 21,21 g NaCl; 1,2 g KCl; 0,18 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,24 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3 g Glucose; 0,03 g Phenolrot und 14,3 g HEPES in 2,5 L Zellkulturwasser gelöst, mit NaOH oder HCl auf pH 7,3 eingestellt, auf 3 L aufgefüllt, auf 500 ml Flaschen verteilt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.
- **Collagenase B Lösung:**  
Collagenase B wurde zum Dissoziieren von EB's verwendet. Für den Verdau wurde eine 0,2% Lösung des Enzyms im DMEM mit 10  $\mu\text{g/ml}$  DNaseI verwendet.
- **Lysispuffer:**  
Dieser Puffer wurde zum Lysieren von Zellen verwendet. Es handelt sich hier bei um eine wässrige Lösung mit 100 mM Tris pH 8,5; 5 mM EDTA pH 8; 0,2% SDS; 200 mM NaCl und 40  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K. Der Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

### 2.7.2 Bakterienkultur

- **LB-Medium nach Lenox (Roth):**  
Dieses Medium wurde für Flüssigkulturen verwendet und wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Es diente der Vermehrung von Bakterien für Plasmid-Präparationen

- **LB-Agar nach Lenox (Roth):**

Dieses Medium wurde zum Gießen von Agar-Platten verwendet. Es diente der Kultivierung von Bakterienklonen nach einer Transformation.

- **SOC Medium :**

Es ist ein besonders nährstoffreiches Medium, mit dem Bakterien unmittelbar nach einer Transformation versorgt werden. Es besteht aus SOB (Super Optimal Broth, Roth) Medium, das vor Gebrauch mit 20 mM sterilfiltrierter Glucose erweitert wird.

## 2.8 Zellen

### ES-Zelllinie E14Tg2a.4

Es handelt sich hierbei um wildtyp embryonale Stammzellen, die von dem Mäusestamm 129P2/OlaHsd abgeleitet wurden.

### Murine Embryonale Fibroblasten (MEF)

MEF sind primäre Zellen, die aus 13,5 bis 14,5 Tage alten Maus-Embryonen isoliert wurden. Sie wurden als unterstützendes Substrat für die Kultivierung von ES-Zellen verwendet.

### STO-Zellen

Bei den murinen STO-Fibroblasten handelt es sich um eine spontan transformierte Zelllinie, die aus Sandoz Inzucht-Mäusen etabliert wurde. So wie die primären Fibroblasten unterstützen diese Zellen das Wachstum von embryonalen Stammzellen. Die STO-Zellen sind resistent gegen Hygromycin, Neomycin und Puromycin. Sie wurden daher bei der Selektion von stabil transfizierten ES-Zellklonen eingesetzt.

### Maus Endothelioma Zellen

Maus Endothelioma Zellen (MEndo) sind eine immortalisierte endothelzell-spezifische Marker exprimierende Zelllinie, die als Positiv-Kontrolle und zum Austesten generierter Konstrukte verwendet wurde.

## HEK 293T Zellen

HEK 293T stellt eine humane embryonale Nierenzelllinie dar, die mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al. 1977). Die Zellen exprimieren das „SV40 large T-Antigen“, welches die Replikation von episomalen, den „SV40 origin of replication“ (SV40-Ori) enthaltenden Plasmiden ermöglicht. Die Zelllinie lässt sich mit hoher Effizienz transfizieren und produziert, aufgrund ihrer Fähigkeit die transfizierte pDNA innerhalb der Zellen zu vermehren, virale Partikel mit sehr hohem Titer.

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1 Gentechnische Verfahren

#### Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken angewendet. Zum Nachweis positiver Bakterienklone oder selektierter ES-Zellklone wurde ein PCR-Mix der Firma Bioline (MangoMix), der die *Taq*-Polymerase enthält, verwendet.

Die präparative PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die als *inserts* für die Herstellung von Plasmid-DNA (pDNA) Konstrukten dienen, angewendet. Dies wurde mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase bewerkstelligt, die im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine *proofreading* Fähigkeit besitzt. Es wurden Sequenzen sowohl aus der Plasmid- als auch aus der genomischen DNA amplifiziert.

Die Oligonukleotide für die Amplifikation von *inserts* hatten in meisten Fällen eine Länge von 31 Basen und bestanden aus dem entsprechenden, 20 Basen langen Primer, der an seinem 5'-Ende einen Anhang aus 5 zufällig gewählten Basen und einer für die



**Abbildung 2.9: Beispiel eines Oligonukleotides für die Amplifikation eines *inserts***

1: zufällig gewählte Basen; 2: Restriktionsschnittstelle; 3: Primersequenz

anschließende Ligation notwendigen Restriktionsschnittstelle hatte.

## Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der restriktive Verdau von DNA wurde zu Klonierungszwecken eingesetzt. Da für die Aufreinigung gewünschter Fragmente der Einsatz von Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion notwendig ist, wurde, um eine ausreichende Produktmenge zu erzielen, im Allgemeinen 5  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA bzw. 1  $\mu\text{g}$  des aus der PCR stammenden *inserts* verdaut. Die Restriktionsenzyme wurden von Fermentas bezogen, die Reaktionsansätze wurden gemäß der Anleitung des Herstellers angesetzt. Das Reaktionsendvolumen wurde der zu verdauenden DNA Menge angepasst und variierte zwischen 20 und 50  $\mu\text{l}$ . Je nach Möglichkeit, was schon bei der Planung der Klonierungsprozedur berücksichtigt wurde, wurde der Verdau gleichzeitig mit zwei Endonukleasen durchgeführt. Nach erfolgter Reaktion und elektrophoretischer Auftrennung wurde das jeweilige gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde dabei mit 30  $\mu\text{l}$  Wasser von den Säulchen eluiert.

## Linker Synthese

In einigen Fällen ist es zweckmäßig beim Klonieren kurze Sequenzen doppelsträngiger DNA selbst herzustellen. So wurde bei der Generierung von pGZ-Flk eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingefügt. Dazu wurden zwei zu einander komplementäre Oligonukleotide (S\_SalI-link und AS\_SalI-link) in einer Hybridisierungsreaktion zusammengefügt. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

H <sub>2</sub> O	11 $\mu\text{l}$
10× Puffer A	2 $\mu\text{l}$
ATP (10 mM)	2 $\mu\text{l}$
S_SalI-link (100 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{l}$
AS_SalI-link (100 mM)	2 $\mu\text{l}$
T4 PNK	1 $\mu\text{l}$
<hr/>	
	20 $\mu\text{l}$

Die Reaktion erfolgte zunächst für eine Stunde bei 37°C und dann in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm:

- Beginn bei 95°C 2 min., dann -0,8°C/Zyklus (20 sek.)
- 99 Zyklen
- Ende bei 15°C

## Ligation

Nachdem die Vektor-DNA und das *insert* mit den gleichen Enzymen verdaut wurden, können diese in einer enzymatischen Reaktion an den durch den Verdau entstandenen, „kompatiblen“ Enden verknüpft werden. Diese Reaktion wird als Ligation bezeichnet und wird von der T4-Ligase katalysiert. Sie katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5'-Phosphat- und freien 3'-Hydroxy-Gruppen. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (Fermentas) in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden 50 oder 100 ng Vektor-DNA eingesetzt, das molare Verhältnis Vektor zu *insert* betrug stets 1:3.

Die Ligation kann zum Entstehen mehrerer Produkte führen. Zum Einen kann nach dem Restriktionsverdau ein aus dem Gel extrahiertes Fragment mit dem nicht verdauten Vektor kontaminiert sein, zum Anderen kann das besagte Fragment bei ausreichender Länge re-ligiert werden. Aus diesem Grund wurde als Negativ-Kontrolle jeweils ein Ligationsansatz gemacht, bei dem das *insert* weggelassen wurde.

## n-Butanol Fällung

Nach der Ligation wurde die eingesetzte DNA gefällt, um die für die Reaktion notwendigen Salze zu entfernen. Dies ist erforderlich, da Salze die anschließende Elektroporation von Bakterien stören würden. Der Reaktionsansatz wurde dazu mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt, mit 1 ml n-Butanol versetzt und durch vortexen gründlich vermischt. Der Ansatz wurde anschließend für 20 min bei 17000×g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70%igem Ethanol versetzt (zum Waschen) und für weitere 5 min bei 17000×g zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde anschließend in

10  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und in Bakterien transformiert (siehe Abschnitt 2.9.3 auf Seite 35).

### PCR-Screen von Bakterienklonen

Der Nachweis von Bakterienkolonien, die das gewünschte Klonierungsprodukt aufgenommen haben, wurde mittels einer PCR durchgeführt. Von dem Primerpaar, das für die Reaktion eingesetzt wurde, befand sich ein Primer innerhalb des Vektors ein anderer innerhalb des *inserts*. So konnte gleich sichergestellt werden, dass das *insert* sich im Vektor befindet und richtig orientiert ist.

Je nach Dichte der Kolonien auf der Kontrollplatte (Ligation ohne *insert*) im Verhältnis zur Koloniedichte auf der Ligation-Platte wurden von dieser 8 und mehr Kolonien gepickt. Die Kolonien wurden zunächst in 20  $\mu\text{l}$  Wachstumsmediums suspendiert und für 1 bis 2 Stunden im Heizblock bei 37°C geschüttelt. 2  $\mu\text{l}$  dieser Suspension dienten anschließend als Template für die PCR. Die Reste der durch die PCR als positiv gezeigten, suspendierten Kolonien wurden schließlich zum Animpfen von Flüssigkulturen für Plasmid-Minipräparationen verwendet. Nach jeder Ligation wurden zunächst, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, das von Mutationen freie Klonierungsprodukt zu erhalten, vier Flüssigkulturen für die anschließende Sequenzierung des subklonierten *inserts* angeimpft.

### Plasmid-Präparationen

Abhängig von dem Klonierungsabschnitt und der daraus folgenden erforderlichen Menge an Plasmid-DNA wurden Mini- bzw. Maxipräparationen durchgeführt. Minipräparationen wurden bei Zwischenschritten angefertigt und lieferten zwischen 10 und 30  $\mu\text{g}$  pDNA. Zum extrahieren wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet, die DNA wurde mit 100  $\mu\text{l}$  Wasser von den Säulchen eluiert. Von fertig klonierten Konstrukten wurden mit Hilfe des NucleoBond® Xtra Maxi Kits (Macherey Nagel) Maxipräparationen angefertigt, diese lieferten dann bis zu 1 mg pDNA. Die auf diese Weise gewonnene Vektor-DNA wurde schließlich zur Transformation von Zellen benutzt.

## 2.9.2 Herstellung von Vektoren

### pFlk (Abbildung 2.2)

Bei der Herstellung des pFlk-Vektors wurde zunächst der Flk-1-Promoter anstelle des  $\alpha$ -mMHC-Promoters in den pMNHC unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen von XhoI und BspTI kloniert. Die Sequenzen des Flk-1-Promoters und des Enhancers wurden von Stefanie Bachmann zur Verfügung gestellt. Der Promoter wurde unter Verwendung folgender Primer

vorwärts: **SP Flk promoter**    catatctcgagcgaccagccaggaagttc  
 reverse: **AS Flk promoter**    gtatacttaagcctgcacctgcgcgtgg

amplifiziert (die unterstrichenen Bereiche zeigen die Erkennungssequenzen der REN XhoI und BspTI). Für die Amplifikation des Enhancers wurden folgende Primer verwendet

vorwärts: **SP Flk enhancer**    tcgagctctaaatgtgctgtctttagaagcc  
 reverse: **AP Flk enhancer**    tacccggggtccaataggaaagccctt

Der Enhancer wurde anschließend an den Restriktionsschnittstellen von SacI und SmaI in das bereits den Promoter enthaltende Plasmid ligiert. Im ursprünglichen Vektor unmittelbar nach dem Neomycin-Resistenzgen (Neo) folgte ein pA-Signal, ohne dass sich zwischen dem Gen und dem Signal eine geeignete Restriktionsschnittstelle befand. Daher wurde Neo aus dem Plasmid unter Ausschluss des pA-Signals und unter Verwendung folgender Primer

vorwärts: **SP\_neo\_BspTI**        tgcaggccttaagcggc  
 reverse: **AP\_neo\_SalI\_hTm**    gtatagtcgacgccgatcccctcagaagaactc

amplifiziert und an den Schnittstellen von BspTI und SalI in das bereits den Flk-1-Promoter und den Enhancer enthaltende Plasmid ligiert.

### pVE-Cad (Abbildung 2.3)

Für die Herstellung von pVE-Cad wurde zunächst, wie bei der Herstellung von pFlk, der  $\alpha$ -mMHC-Promoter durch den VE-Cadherin-Promoter ersetzt. Die Aktivität des Promoter wurde bereits von (Gory et al. 1999) analysiert und beschrieben. Der Promoter-Bereich zwischen den Basenpaaren -2486 und +24 wurde unter Verwendung folgender Primer

vorwärts: **SP\_VE-Cad**    gtatactcgagcatgcagtcaggagggagccagaa  
reverse: **ASP\_VE-Cad**    ctatacttaagagtctgtccagggccgagctttgtg

amplifiziert, als Template diente dabei eine Präparation genomischer DNA. Anschließend wurde das Neomycin-Resistenzgen gegen die gesamte neo-IRES-EGFP-Kassette aus dem fertigen pFlk Plasmid an den Schnittstellen von BspTI und SacI getauscht.

### pcDNA-PGK-EGFP (Abbildung 2.4)

Der CMV-Promoter des Plasmids pcDNA<sup>TM</sup>5/TO, der in ES-Zellen stark dem epigenetischen Silencing unterliegt, wurde gegen den PGK-Promoter ersetzt. Dazu wurde der PGK-Promoter mit den Primern

vorwärts: **SP-PGK-MluI**    gtataacgcggtaccgggtagggaggcgctt  
reverse: **AP-PGK-BspTI**    ctatacttaagggtggcgggatgcaggtcga

aus dem Vektor pMHC amplifiziert und an den Schnittstellen von MluI und BspTI ins Plasmid ligiert.

### pGZ-Flk (Abbildung 2.6)

Der CMV-Promoter des pGZ-CMV Vektors wurde an den Restriktionsschnittstellen ClaI und NheI durch den aus dem pFlk unter Verwendung der Primer

vorwärts: **SP-Flk-ClaI**    gaattccatcgatcgaccagccaggaagttcaca  
reverse: **AP-Flk-NheI**    gtggccgctagcgcctgcacctcgcgctgggcacag

amplifizierten Flk-1-Promoter ersetzt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Linkers, für dessen Herstellung folgende Oligonukleotide verwendet wurden (Abschnitt 2.9.1)

vorwärts: **S\_SalI-link**    tcgactcgacaatcaacctccccgggt  
reverse: **AS\_SalI-link**    tcgaaccggggaggttgattgtcgag

neben der SalI Restriktionsschnittstelle die SmaI Schnittstelle in den Vektor eingefügt. Schließlich wurde der Enhancer aus einem der Zwischenprodukte der pFlk Herstellung mit Hilfe der REN SmaI und SalI herausgeschnitten und für die Generierung von pGZ-Flk in den Vektor ligiert.



### 2.9.3 Bakterienkultur

Bakterien wurden zur Vermehrung von Plasmiden benutzt. Es wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue mit dem folgenden Genotyp eingesetzt:

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

Der XL1-Blue Stamm eignet sich besonders für routinemäßige Klonierungsanwendungen. XL-1 Zellen sind tetrazyklinresistent. Sie sind Endonuklease-defizient (*endA*), was die Qualität der DNA-Präparationen deutlich verbessert. Des Weiteren sind die Zellen rekombinationsdefizient (*recA*), was die *insert*-Stabilität verbessert. Die *hsdR* Mutation verhindert die Spaltung der klonierten DNA durch das *EcoK* Endonuklease-System. Das *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15* Gen auf dem F' Episom ermöglicht das *blue-white screening*.

### Transformation

Bakterien wurden über Elektroporation transformiert. Ein Aliquot (100  $\mu$ l) elektrokompenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit 10  $\mu$ l aus n-Butanol Fällung stammender DNA-Lösung vermischt. Anschließend wurde der Mix in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und einem für Bakterien üblichen Strompuls (1,8 kV; 25  $\mu$ FD; 200 Ohm; *capacitance extender* auf 250) ausgesetzt. Unmittelbar nach der Pulsgabe wurden die Bakterien mit 800  $\mu$ l vorgewärmten SOC-Mediums vermischt und in ein 1,5 ml Reaktions-Gefäß überführt. Schließlich wurden die Zellen für 40 min in einem Heizblock bei 37°C und 500 rpm geschüttelt und auf Agar-Platten mit 80  $\mu$ g/ml Ampicillin enthaltenden Selektivmedium verteilt.

### Vermehrung von Bakterien

Der erste Schritt bei der Bakterienvermehrung bestand darin, die transformierten Zellen auf Platten mit Selektivmedium zu verteilen und sie in einem Brutschrank bei 37°C zu kultivieren. Dies diente in erster Linie der Selektion Antibiotika-resistenter Bakterienklone. Nachdem die Anwesenheit des gewünschten Vektors in diesen Klonen über PCR bestätigt wurde, wurden diese zum Anfertigen von Plasmid-Minipräparationen in 3 ml LB-Medium

bei 37°C und 200 rpm für 16 h geschüttelt. Der letzte Schritt der Vermehrung bestand in der Anfertigung einer Plasmid-Maxipräparation. Dies erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für eine Minipräparation, das Volumen der Flüssigkultur betrug jedoch 300 ml. Alle für die Bakterienkultur benutzten Medien (außer SOC-Medium) enthielten 80 µg/ml Ampicillin.

## 2.10 Zellbiologische Methoden

Alle Zelltypen, die in der vorliegenden Arbeit (außer HEK-Zellen) verwendet wurden, wurden auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Zum Beschichten wurde eine 0,2%ige Gelatine Lösung für mindestens 30 min bei 37°C in Schalen gegeben und unmittelbar vor Gebrauch wieder abgesaugt.

Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden die Zellen für 5 min bei 200×g zentrifugiert.

### 2.10.1 Auftauen von Zellen

Vor dem Auftauen wurden in ein 50 ml Röhrchen 10 ml des dem aufzutauenden Zelltyp entsprechenden Mediums vorgelegt. Danach wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in das vorgelegte Medium überführt, 5 min bei 200×g pelletiert, im Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale gegeben.

### 2.10.2 Passagieren von Zellen

Wenn Zellen auf einer Kulturschale ihre Konfluenz (die Zellen bedecken die gesamte Wachstumsfläche, jedoch bevor die Kontaktinhibition der Zellteilung eintritt) erreicht haben, müssen diese auf eine neue Schale umgesetzt (passagiert) werden.

Zum Passagieren wurden zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt und diese einmal mit Calcium und Magnesium freiem Puffer gewaschen (für die ES-Zellen wurde dazu HEPES Puffer verwendet), anschließend wurde die Kultur mit Trypsin-EDTA Lösung (Gibco) überschichtet, die nach einer Minute wieder abgezogen wurde. Nach einigen Minuten Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen im Medium durch das auf und ab Pipettieren bis zum Erreichen einer Einzelzellsuspension suspendiert. Die Suspension

wurde schließlich zu einem Teil (je nach Zelltyp) auf eine neue Schale übertragen oder auf mehrere Schalen verteilt (gesplittet).

### 2.10.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden zunächst, wie beim Passagieren von Schalen abgelöst und für 5 min. bei  $200\times g$  pelletiert. Das Pellet wurde in FCS resuspendiert, mit dem gleichen Volumen an DMEM + 20% DMSO vermischt und zu je 1 ml auf Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden dann nach 24 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Stickstofftank in der Gasphase aufbewahrt.

### 2.10.4 Murine embryonale Fibroblasten

Embryonale Stammzellkultur wurde in einer Kokultur auf einer Einzelschicht mitotisch inaktiver muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) aufrecht erhalten.

#### 2.10.4.1 Isolierung von MEF

Für die Isolierung von MEF wurden schwangere Mäuse am 13,5 bis 14,5 Tag der Schwangerschaft verwendet. Die Mäuse wurden durch Genickbruch abgetötet und anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert. Danach wurde das Abdomen mit abgeflammt Instrumenten geöffnet und der Uterus in eine Petrischale mit 10 ml PBS überführt. Im Anschluss an die Entnahme der Embryonen aus dem Uterus und Fruchtblase und dem dreifachen Waschen im PBS wurden diesen Köpfe und Visceralgewebe entfernt. Anschließend wurden die Embryonen in eine neue Petrischale transferiert und erneut drei Mal mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Embryonen auf jeweils eine Petrischale überführt und mit kleiner Schere 10-15 Minuten lang zerkleinert. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-Lösung wurden die Embryonen weiter zerkleinert, mit zusätzlichen 5 ml Trypsin-Lösung versetzt und nach gründlichem Perpetuieren für 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 20 ml MEF-Medium suspendiert und 5 min bei  $200\times g$  zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellpellets in je 30 ml MEF-Medium resuspeniert, auf je 3 10 cm Kulturschalen verteilt und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf neue Schalen passagiert und dabei 1:5 gesplittet. Die MEF wurden schließlich nach Erreichen der Konfluenz eingefroren.

#### 2.10.4.2 Mitotische Inaktivierung von MEF

Bevor die MEF für die Stammzellkultur verwendet werden können, müssen sie mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert werden. Dadurch verlieren sie die Fähigkeit, sich weiter zu teilen. Die inaktivierten MEF werden im weiteren Verlauf als *feeder* bezeichnet.

Zu Beginn der Prozedur wurden zwei Kryoröhrchen isolierter MEF auf eine 15 cm Schale im MEF-Medium aufgetaut und über zwei Passagen auf zehn 15 cm Schalen vermehrt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das MEF-Medium durch das Inaktivierungsmedium ersetzt und die Zellen für 2-4 Stunden weiter inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und für die Langzeitlagerung eingefroren.

Die Präparation lieferte üblicherweise 50 Kryoröhrchen gebrauchsfertiger *feeder*, wobei ein Kryoröhrchen für 6-8 35 mm Schalen ausreichte, auf welchen die ES-Zellkultur routinemäßig aufrecht erhalten wurde.

Die Inaktivierung der Hygromycin-resistenten STO-Zellen wurden auf die gleiche Weise wie die der MEF durchgeführt.

#### 2.10.5 Embryonale Stammzellkultur

Die ES-Zellkultur wurde auf 35 mm Schalen im Inkubator bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im ES-Medium auf einer Einzellschicht aus *feeders* aufrecht erhalten.

Für die ES-Zellen wurden die *feeder* einen Tag zuvor auf mit Gelatine beschichtete Schalen, im ES-Medium ohne LIF ausplattiert. Eine Stunde bevor die ES-Zellen auf die *feeder* ausgesät wurden, wurde das Medium gegen das LIF-haltige ES-Medium ausgetauscht. Der Mediumwechsel erfolgte jeden Tag, die Zellen wurden alle zwei Tage passagiert. Dies ist generell notwendig, da die ES-Zellkolonien sonst zu groß werden, so dass bei den Zellen im Inneren der Kolonien aufgrund der Unterversorgung mit Sauerstoff und LIF der Stammzellstatus nicht gewährleistet werden kann.

Bei routinemäßiger Aufrechterhaltung der ES-Zellkultur wurden die Zellen beim Passagieren in 1 ml ES-Medium suspendiert und je nach Dichte und Größe der Kolonien in einem Volumen von 20 bis 50  $\mu$ l (1:50 bis 1:20) auf einer neuen Schale gleichmäßig verteilt.

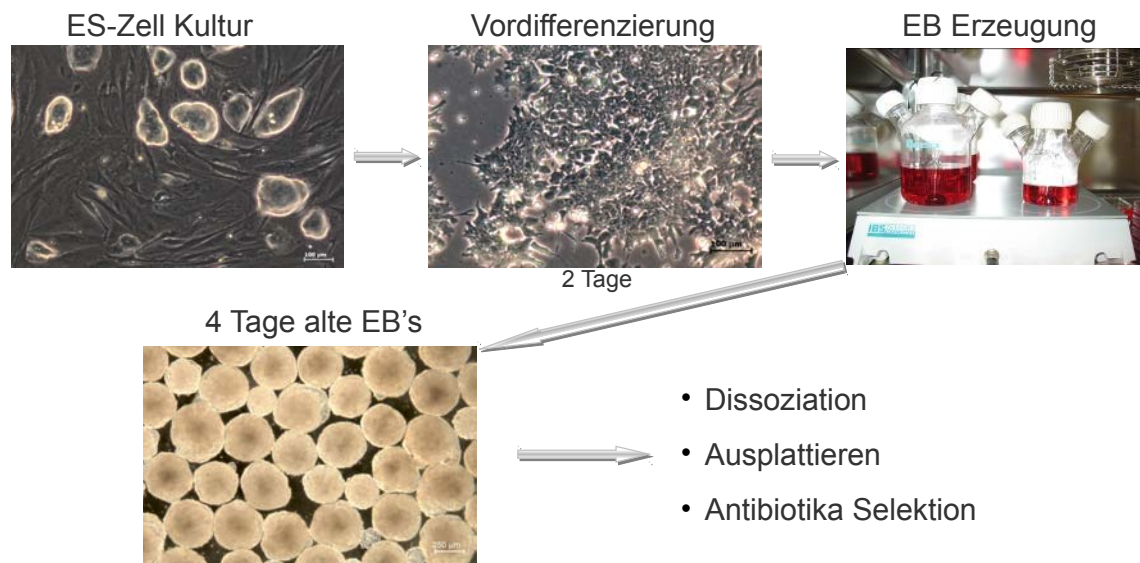
### 2.10.5.1 Differenzierung

Für den Erfolg der Differenzierung war zunächst die Menge von Flk-1-positiven Zellen, die eine Differenzierungsmethode hervorbringt, ausschlaggebend. Die Erzeugung von *embryoid bodies* (EB) erwies sich als unproblematisch. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, ohne den Einsatz von teuren Wachstumsfaktoren, einen prozentual hohen Anteil an Flk-1-positiven Zellen zu generieren.

Vor der Differenzierung mussten die *feeder* weitestgehend aus der ES-Zellkultur entfernt werden, dazu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin abgelöst und auf eine neue mit Gelatine beschichtete Schale gegeben. Die *feeder* werden schneller adherent, so dass nach ca. 45 min der Überstand mit den darin noch suspendierten ES-Zellen auf eine neue Schale überführt werden konnte. Die so erhaltene Zellkultur wurde für 2 Tage im Differenzierungsmedium, in Abwesenheit von *feedern* kultiviert (siehe Abbildung 2.10 auf Seite 40). Dieser Schritt wird im Folgenden als Vordifferenzierung bezeichnet. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin abgelöst, gezählt und eine Million davon in 15 ml Differenzierungsmedium für die Erzeugung von EB auf eine Petrischale überführt. Die Verwendung von Petrischalen, deren Wachstumsoberfläche nicht für eine Gewebekultur behandelt wurde, verhinderte das Anwachsen von Zellen, darüber hinaus wurden diese durch ständiges Schwenken auf einem Schüttler in Suspension gehalten.

### 2.10.5.2 *magnetic beads*-Isolierung Flk-1-positiver Zellen

Vier bis sechs Tage alte EB wurden auf eine 60 mm Schale überführt und mit HEPES Puffer gewaschen. Anschließend wurden die EB's mit 5 ml Collagenase B Lösung versetzt und für 40 min. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach mehrmaligem, vorsichtigem auf und ab Pipettieren wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit HEPES Puffer aufgefüllt und 5 min bei 200×g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 15 ml HEPES Puffer resuspendiert, über einen 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen gegeben und schließlich über einen 40 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und pelletiert. Das Pellet wurde zum Blocken in 1 ml FCS eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Puffer (0,3% BSA in PBS) auf 10 ml aufgefüllt, ein kleines Aliquot zum Bestimmen der Zellzahl entnommen und die Zellen erneut pelletiert. Die Zellen wurden dann in einem einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  entsprechenden Volumen Puffer resuspendiert und mit einer entsprechenden Menge



#### Abbildung 2.10: Differenzierungsprozedur

Das erste Bild im Diagramm zeigt ES-Zellkolonien auf *feeder*-Zellen. Im zweiten Bild sieht man die ES-Zellen nach zwei Tagen auf mit Gelatine beschichteter Schale in Abwesenheit von LIF und *feeder*. Die dritte Abbildung ist eine Symboldarstellung für Suspensionskultur, tatsächlich wurden die EBs in 10 cm Schalen auf einem Schüttler erzeugt. Das letzte Bild zeigt embryoid bodies nach vier Tagen in Suspensionskultur.

primären Antikörper Lösung ( $4\ \mu\text{l}$  Lösung/ $1 \times 10^6$  Zellen) vermischt. Anschließend wurden die Zellen 20 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen ein Mal mit 10 ml Puffer gewaschen, in  $500\ \mu\text{l}$  Puffer suspendiert, mit  $25\ \mu\text{l}$  *magnetic beads*-Suspension versetzt und 20 min. lang auf einem Kipp-Rotationsschüttler bei  $8^\circ\text{C}$  inkubiert. Schließlich nach drei Waschschritten wurden die Zellen im Differenzierungsmedium auf einer Zellkultur-Platte verteilt.

#### 2.10.5.3 Stabile Transfektion von ES-Zellen

##### Elektroporation

Die ES-Zellen wurden mit Hilfe von Elektroporation transfiziert. Es wurden der pFlk Vektor (Abbildung 2.2 auf Seite 22) und der pVE-Cad Vektor (Abbildung 2.3 auf Seite 22) verwendet. Für die stabile Transfektion wurden  $30\ \mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Eam1105I* linearisiert und mit n-Butanol, wie in Abschnitt

2.9.1 beschrieben, gefällt. Nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet unter der Sterilbank getrocknet, in 30  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,5 und 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Vor der Elektroporation wurde diese DNA-Lösung mit 300  $\mu$ l HEPES-Puffer vermischt.

Für die Transfektion benötigte man  $1,3 \times 10^7$  Zellen. Die ES-Zellen wurden zunächst auf *feeder*-Zellen in einer 10 cm Schale vermehrt. Anschließend wurden sie mit Trypsin-EDTA Lösung abgelöst und in der Neubauer-Zählkammer gezählt, dabei wurde nur die Anzahl von Stammzellen bestimmt, deren Morphologie von der der Fibroblasten unterschieden werden kann. Das entsprechende Volumen wurde zentrifugiert und die pelletierten Zellen in 500  $\mu$ l HEPES-Puffer suspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der DNA-HEPES-Puffer Lösung vermischt und in eine Küvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Das Gemisch wurde dann einem Strompuls mit einer Spannung von 250 V und einer Dauer von 2 ms ausgesetzt. Nach der Pulsgabe wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie in jeweils 10 ml ES-Medium auf drei 10 cm Platten mit STO-Zellen verteilt und im Inkubator kultiviert wurden. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen Selektivmedium mit 250  $\mu$ g/ml Hygromycin ausgetauscht. Die transfizierten Zellen wurden fünf Tage kultiviert, bis einzelne Hygromycin-resistente Kolonien sichtbar wurden, wobei das Selektivmedium jeden Tag gewechselt wurde.

### Picken von Klonen

Nach der Antibiotikaselektion wurden einzelne Klone gepickt, wobei die Kolonien jeweils in ein Loch einer 96-Lochplatte überführt wurden. Die 96-Lochplatte wurde einen Tag zuvor mit Gelatine beschichtet und mit *feedern* besät. Zum Picken wurde das Medium auf der die Klone enthaltenden Schale durch 15 ml HEPES-Puffer ersetzt. Gepickt wurde unter einem in der Sterilbank platzierten Mikroskop, mit einer auf 20  $\mu$ l eingestellten Pipette. Um die Zellen der gepickten Kolonien zu vereinzeln, wurden diese zunächst in einer 96-well Platte mit U-Boden in 50  $\mu$ l Trypsin/EDTA für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in die vorbereitete 96er *feeder*-Platte mit jeweils vorgelegten 200  $\mu$ l ES-Medium überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Des Weiteren wurden am selben Tag vier 24-Lochplatten mit Gelatine beschichtet und mit *feedern* besät, wobei ein *feeder*-Kryostock pro Platte aufgetaut wurde.

### Passagieren und Einfrieren von Klonen

Zwei Tage nach dem Picken wurde ein Teil der Klone auf am Tag zuvor vorbereitete 24-Lochplatten mit *feedern* passagiert und der Rest eingefroren. Dazu wurden Zellen auf der 96er-Platte mit jeweils 100  $\mu$ l HEPES-Puffer gewaschen, mit je 50  $\mu$ l Trypsin/EDTA abgelöst (3 min bei 37°C) und anschließend mehrmals auf und ab pipettiert. Dann wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension in jeweils ein Loch der am Tag davor vorbereiteten 24er-Platte, das bereits 2 ml ES-Medium ohne LIF enthielt, überführt. Die Trypsin-Reaktion in den restlichen 40  $\mu$ l der Zellsuspension wurde mit 40  $\mu$ l ES-Medium gestoppt. Anschließend wurden 80  $\mu$ l Einfriermedium dazugegeben und alles mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet. Die 96er-Platte wurde dann mit Parafilm umwickelt und bei -80°C eingefroren.

### Extraktion genomischer DNA aus selektierten Klonen

Die 24-Lochplatten wurden inkubiert, bis sie dicht gewachsen waren und das Medium verbraucht war. Die Zellen wurden mit jeweils 500  $\mu$ l PBS gewaschen und mit 500  $\mu$ l Lysispuffer überschichtet. Nach zwei Tagen bei 37°C wurden zu dem Lysispuffer 500  $\mu$ l 100% Isopropanol dazu gegeben, um die DNA zu fällen. Die Platte wurde anschließend 20-30 min auf einem Schüttler inkubiert, bis sich die DNA zu sichtbaren Fäden verdrillt hat. Diese wurden dann jeweils mit einer Pipettenspitze gefischt, in 100  $\mu$ l TE-Puffer überführt und über Nacht bei 56°C gelöst.

### PCR-screen selektierter Klone

Um die Transgenintegration zu überprüfen, wurde zunächst ein PCR-screen der gewonnenen genomischen DNA durchgeführt. Dazu wurden zwei Primerpaare verwendet, die an beiden äußeren Enden des Konstruktes platziert waren und unter Anderem der Überprüfung der Vollständigkeit des Konstruktes dienten. Für das 5'-Ende des Konstruktes pFlk wurden die Primer SP-Flk-scr / AP-Flk-scr und für das 3'-Ende die Primer SP-GE-scr / AP-GE-scr verwendet (siehe Abbildung 2.2 auf Seite 22). Bei der Transfektion mit dem Vektor pVE-Cad wurden für das 5'-Ende das Primer-Paar SP-VE-scr / AP-VE+MHC-scr und für das 3'-Ende SP-GP-scr / AP-GP-scr verwendet (Abbildung 2.3 auf Seite 22).



### Auftauen PCR-positiver Klone

Einen Tag vor dem Auftauen der Klone wurde eine entsprechende Anzahl 24er-Platten mit Gelatine beschichtet und mit *feedern* besät. Zum Auftauen wurde die Klonen enthaltende 96er-Platte zunächst in einem 37°C Wasserbad gehalten und anschließend zügig auf die bereits beschichteten 24er-Platten überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und 6-Loch Platten mit Gelatine beschichtet und MEFs besät. Wenn die Zellen in den 24er-Platten dicht genug gewachsen waren, wurden sie auf die vorbereiteten 6-Loch Platten umgesetzt. Dazu wurden die mit HEPES-Puffer gewaschenen Zellen mit je 500  $\mu$ l Trypsin abgelöst und die Reaktion mit weiteren 500  $\mu$ l Medium abgestoppt. 800  $\mu$ l der jeweiligen Zellsuspension wurden anschließend auf die 6er-Platten übertragen. Die restlichen 200  $\mu$ l wurden für 45 min zum Entfernen der *feeder* auf mit Gelatine beschichteten 24er-Platten übertragen, wo die Zellen zum Vordifferenzieren zwei Tage lang kultiviert wurden. Die EB-Erzeugung fand in 6-Loch Suspensionskultur-Platten auf einem Schüttler statt.

### FACS-screen

Der FACS-screen diente der Identifizierung von Klonen mit funktionierendem Transgen, d.h. dass während der ES-Zelldifferenzierung entstehende Endothelzellen unter anderem auch GFP-Expression zeigen. Die in 6-Loch Suspensionskultur-Platten aus selektierten Klonen erzeugten EBs wurden jeweils unter Einsatz von Trypsin dissoziiert und deren GFP-Expression in einem FACS-Gerät mit der GFP-Expression dissoziierter EBs nichttransfizierter und mit pcDNA-PGK-GFP (Abbildung 2.4) transfizierter ES-Zellen verglichen.

#### 2.10.5.4 Transduktion von ES-Zellen

Die Transduktion der ES-Zellen erfolgte mit den frisch geernteten viralen Partikeln (siehe Abschnitt 2.10.7.1). Es wurden 2000 ES-Zellen in einem mit Gelatine beschichteten Well einer 24-Well Platte in 500  $\mu$ l ESC-Medium mit einer doppelten Menge an LIF vorgelegt. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit dem gleichen Volumen des Virus und 16  $\mu$ g/ml Polybrene enthaltenden Überstandes vermischt. Die Zellen wurden anschließend über Nacht inkubiert und auf eine den *feeder-layer* enthaltende 10 cm Schale umgesetzt.

Schließlich wurden die Zellen so lange kultiviert (5 bis 7 Tage), bis die Kolonien groß genug zum Picken waren. Im Gegensatz zur Transfektion wurden hier, dank hoher Effizienz, keine Antibiotika zum Selektieren positiver Klone eingesetzt.

#### Picken und Screen positiver Klone

Das Picken von Klonen erfolgte wie in Abschnitt 2.10.5.3 beschrieben ist. Es wurden  $2 \times 96$  Klone gepickt. Im Gegensatz zur Transfektion wurde an dieser Stelle auf ein PCR-Screen verzichtet, viel mehr wurde hier direkt nach funktionierenden Transgenen gesucht. Dazu wurden zunächst die Klone enthaltenden 96er Platten dupliziert, wobei jeweils eine Kopie für die Dauer des Screens bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Die Differenzierung der nicht konservierten Zellen wurde dann im 96er Format durchgeführt. Alle Schritte, wie das Vermehren der Zellen, das Entfernen der *feeder* aus der Kultur, das Vordifferenzieren, sowie die Herstellung von EBs, erfolgte in 96-Well Platten. Zum Herstellen der EBs wurden die Platten mit Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (polyHEMA, Sigma) beschichtet. Die anschließende Suche nach GFP-exprimierenden EBs erfolgte visuell unter einem Fluoreszenzmikroskop. Die EBs positiver Klone wurden danach zum Anwachsen auf mit Gelatine beschichtete 24-Well Platten umgesetzt, um die Entstehung GFP-exprimierender vaskulärer Strukturen zu beobachten.

#### 2.10.6 Murine Endothelioma Zellen

MEndo wurden auf mit Gelatine beschichteten 10 cm Schalen mit 10 ml MEndo-Medium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte zwei Mal in der Woche. Vor dem Passagieren wurde das Medium für 15 min gegen PBS ersetzt, so ließen sich die Zellen mit Trypsin leicht von den Schalen ablösen. Die MEndo-Zellen wurden beim Umsetzen auf neue Schalen maximal 1/5 gesplittet.

Die Endothelioma Zellen wurden für die Überprüfung der hergestellten Konstrukte auf Funktion verwendet. Sie wurden mit pFlk bzw. pVE-Cad transfiziert, wobei als Transfektionsmethoden Elektroporation oder diverse Transfektionsreagenzen zum Einsatz kamen. Ebenso wurden die Zellen für die Transduktion mit pGZ-Flk verwendet.

### 2.10.7 HEK 293T Zellen

Die HEK-Zellen wurden zur Produktion viraler Partikel eingesetzt (Naldini et al. 1996a). Die Zellen wurden auf mit Gelatine beschichteten Schalen im entsprechenden Medium kultiviert. Die HEK-Zellen wurden üblicherweise aufgetaut, vermehrt, mindestens ein Mal passagiert und für die Viren-Produktion transfiziert.

#### 2.10.7.1 Herstellung viraler Partikel

Zur Herstellung viraler Partikel wurde die 70-80% konfluente HEK-Zellkultur verwendet. Dazu wurden die Zellen mit drei Plasmiden: dem Transferplasmid, dem Verpackungsplasmid (psPAX2) und dem Hüllplasmid (pMD2.G) in einem Mengenverhältnis von 3:2:1 unter Verwendung des Transfektionsreagenz TurboFect (Fermentas, nach Herstellerangaben) cotransfiziert. Die Transfektion erfolge üblicherweise in einer 10 cm Kulturschale. Die optimale Menge an gesamt DNA betrug dabei 8  $\mu$ g. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurde das Medium gegen 7 ml frisches ausgetauscht und bevor die viralen Partikel geerntet wurden für zwei Tage kultiviert. Danach wurde der die Partikel enthaltende Zellkulturüberstand durch einen 0,2  $\mu$ m Sterilfilter gefiltert und entweder direkt auf die zu transduzierende Zellen gegeben oder für wenige Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

## 2.11 Immunfluoreszenzfärbung

### 2.11.1 Immunfluoreszenzfärbung von *embryoid bodies*

Die EBs (ca. 20 pro Färbung) wurden zunächst aus der Schale in ein 1,5 ml Gefäß überführt und mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit -20°C kaltem Methanol oder Methanol/Aceton (1/1) Gemisch für 10 min. fixiert. Nach dreimaligem Waschen (je 1 ml und 5 min.) mit PBST Puffer (PBS + 0,01% TritonX-100) wurden die Antigene der EBs mit 10% FCS in PBST für 1 Stunde geblockt. Danach wurden sie der Anzahl der Färbungen entsprechend in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und mit je 100  $\mu$ l der Primär-Antikörper Lösung versetzt. Die Antikörper wurden stets mit der Lösung, die zum Blocken verwendet wurde, verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die EBs einmalig mit PBST gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 100  $\mu$ l der Sekundär-Antikörper Lösung versetzt und

anschließend mit PBST gewaschen. Wenn nötig wurden die Kerne mit solchen Farbstoffen, wie Sytox Blue, DRAQ5<sup>TM</sup> oder TO-PRO®-3, gefärbt.

### 2.11.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellkulturen

Für die Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkulturen mussten die Zellen direkt auf einem Substrat kultiviert werden, auf dem sie auch gefärbt werden konnten. Dazu wurden Glas-Deckgläschen verwendet, die vor dem Aussähen von Zellen in die Kulturschalen platziert und wie gewohnt mit Gelatine beschichtet wurden. Vor dem verwenden wurden die Deckgläschen im 70% Ethanol gebadet und getrocknet. Eine 60 mm Kulturschale bot so Platz für bis zu 5 Deckgläschen.

Die so in einer Schale auf Deckgläschen gewachsene Kultur wurde unmittelbar vor der Färbung zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 2% Paraformaldehyd (PFA) oder mit -20°C kaltem Methanol für 15 min. bei RT bzw. -20°C fixiert und erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Die mit PFA fixierten Zellen wurden danach mit 1% TritonX-100 Lösung 30 min. bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellkulturen mit 10% FCS in 0,01% PBST zum Blocken der Antigene versetzt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen einzeln auf 35 mm Schälchen verteilt, die zuvor innen mit Parafilm ausgekleidet waren, und mit der Primär-Antikörper enthaltenden Lösung (100 µl) versetzt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend, nach dreimaligem Waschen mit 1 ml PBST, wurden je 100 µl der Sekundär-Antikörper Lösung auf die Gläschen gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Es folgte erneut das dreimalige Waschen mit 1 ml PBST, bevor, zum Färben der Kerne, eine Sytox Blue Lösung für 30 min auf die Zellen gegeben wurde. Schließlich wurden die Deckgläschen dreimal gewaschen und mit den Zellen nach unten auf einem Tropfen Mowiol auf dem Objektträger gebettet.

## 2.12 Durchflusszytometrie (FACS)

Diese Methode wurde zur Analyse von Populationen relevanten Zelltyps in differenzierenden ES-Zellen angewendet. Sie wurde, in Verbindung mit dem Einsatz spezifischer Antikörper, bei der Etablierung optimaler Differenzierung, sowie bei dem Screen nach GFP-exprimierenden ES-Zellklonen eingesetzt.

Die Vorbereitung der Zellsuspensionen für die Analyse, bei der spezifische Antikörper verwendet wurden, entsprach der bereits im Abschnitt 2.10.5.2 beschriebenen Methode, mit dem Unterschied, dass hier anstatt der *magnetic beads* mit einem Fluorochrom konjugierte sekundäre Antikörper eingesetzt wurden. Die Wahl spezifischer Zelloberflächenantigene (CD31, Flk-1, VE-Cadherin) machte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen überflüssig. Um jedoch eben diese Antigene zu erhalten, wurde zur Herstellung der Suspension Collagenase B oder nicht enzymatische Zelldissoziationslösungen, wie zum Beispiel 2 mM EDTA, an Stelle von Trypsin, verwendet. Bei der Herstellung von Suspensionen für die Untersuchung von GFP-Expression wurde Trypsin verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Differenzierung von ES-Zellen

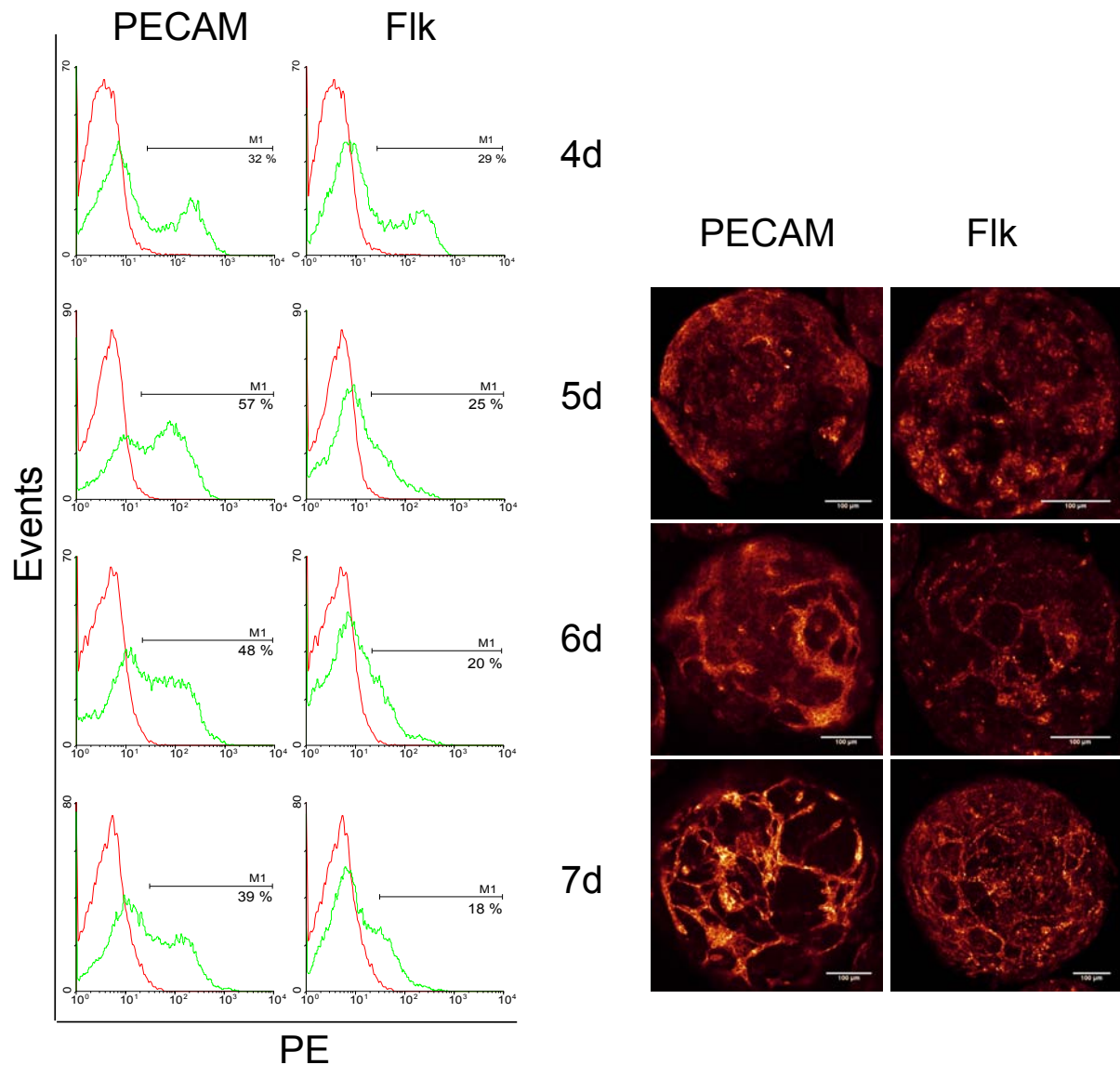
Es sei an dieser Stelle noch mal erwähnt dass das Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer robusten Methode war, routinemäßig eine große Anzahl von Endothel(vorläufer)zellen mit hoher Reinheit herzustellen.

#### 3.1.1 Analyse der Differenzierung

Es wurde zunächst der Versuch unternommen die ES-Zellen, wie bereits von Nishikawa et al. (1998); Yamashita et al. (2000); McCloskey et al. (2004, 2006) beschrieben, in zweidimensionaler Kultur zu differenzieren. Dabei wurden mit Collagen IV beschichtete Schalen verwendet und das Differenzierungsmedium mit bis zu 50 ng/ml VEGF versetzt. Mit dieser Methode konnte man jedoch keine große Anzahl von Zellen kultivieren und sie machte den Einsatz von teuren Reagenzien notwendig.

Mit Hilfe der dreidimensionalen Methode war es relativ einfach, eine sehr große Anzahl an Zellen auf kleinstem Raum zu kultivieren. Innerhalb der EBs differenzieren die ES-Zellen zudem spontan zu Flk-1 oder PECAM (CD-31) exprimierenden Zellen. Der Einsatz von Zytokinen ist dabei nicht erforderlich. Wie in der Studie von Vittet et al. (1996) durch RT-PCR gezeigt wurde, beginnt die Expression von Flk-1 am vierten Tag der EB-Formation. Die Abbildung 3.1 zeigt eine FACS-Analyse endothel-spezifische Marker exprimierender Zellen, sowie entsprechende Färbungen, im zeitlichen Verlauf. Es ist zu beobachten, dass die Anzahl Flk-1 positiver Zellen am vierten Tag der Suspensionskultur am höchsten ist. Die höchste Anzahl PECAM exprimierender Zellen ist am fünften Tag der Differenzierung zu beobachten. Die Anzahl dieser Zellen nimmt mit der Zeit jedoch ab, wobei die vaskulären Strukturen, wie die Färbungen zeigen, immer sichtbarer werden.

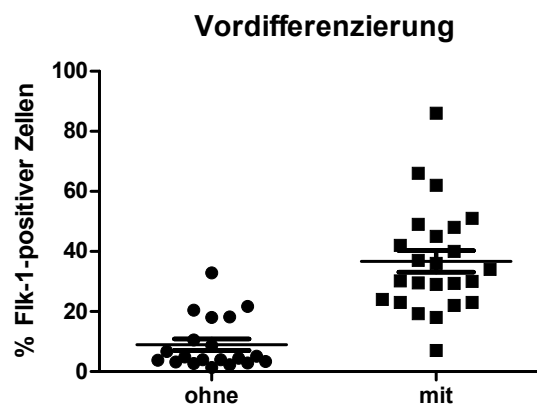
Die Reproduzierbarkeit der in Abbildung 3.1 gezeigten Ergebnisse stellte zu Anfang ein



**Abbildung 3.1: Analyse der Differenzierung**

Die ES-Zellen wurden durch die Erzeugung von EBs differenziert. 4, 5, 6 und 7 Tage alte EBs des selben Ansatzes wurden dissoziiert und auf die Expression von PECAM und Flk-1 hin durchflusszytometrisch untersucht. Des Weiteren wurden die EBs gegen PECAM und Flk-1 immunchistochemisch gefärbt und mit einem Konfokalmikroskop fotografiert.

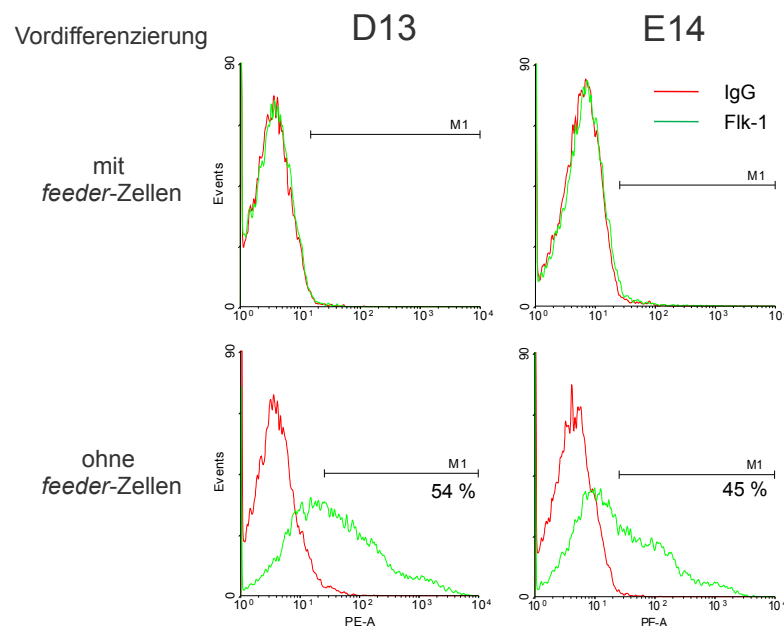
großes Problem dar. Zu Beginn der Studie wurden die ES-Zellen direkt aus der embryonalen Stammzellkultur zur Differenzierung in Suspensionskultur zur Herstellung von EBs überführt. Der Anteil Flk-1 positiver Zellen lag dabei in den meisten Fällen unter 10%. Weitere Experimente haben gezeigt, dass an dieser Stelle ein Zwischenschritt notwendig war. Die Abbildung 2.10 zeigt die endgültige Differenzierungsprozedur in der ein Vordifferenzierungsschritt vorhanden ist. In der Abbildung 3.2 sind alle Durchflußzytometrie-Daten mit und ohne Vordifferenzierung zusammengefasst. Durch diesen Zwischenschritt wurde erreicht, dass die Anzahl Flk-1 positiver Zellen durchschnittlich bei 40% lag. Des Weiteren hat es sich als notwendig herausgestellt, dass die ES-Zellkultur während der Vordifferenzierung weitestgehend frei von *feeder*-Zellen ist. In einem direkten Vergleich wurden zwei verschiedene embryonale Stammzelllinien in Anwesenheit oder Abwesenheit von *feeder*-Zellen vordifferenziert. Beim Entfernen von *feeder*-Zellen aus der ES-Zellkultur vor dem Vordifferenzierungsschritt (siehe Abschnitt 2.10.5.1) erhielt man zwei Kulturschalen, eine nur mit ES-Zellen die andere sowohl mit *feeder*-Zellen als auch mit ES-Zellen. Die so erhaltenen Zellen wurden zwei Tage in Abwesenheit von LIF kultiviert und zur Herstellung von EBs vier Tage in Suspension gehalten. Anschließend wurden die EBs dissoziiert und einer Durchflußzytometrie unterzogen (Abbildung 3.3). Bei den in Anwesenheit von *feeder*-Zellen vordifferenzierten ES-Zellen konnten keine Flk-1 positiven Zellen nachgewiesen werden, der Anteil dieser Zellen bei in Abwesenheit von *feeder*-Zellen



**Abbildung 3.2: Die zusammengefassten Durchflußzytometrie-Daten der Flk-1-Expression vordifferenzierter und nicht vordifferenzierter ES-Zellen**

Alle durch die FACS-Analysen gewonnenen Daten wurden in diesem Graph zusammengefügt. Hier wurde der prozentuale Anteil bei der ES-Zelldifferenzierung entstehender, Flk-1-exprimierender Zellen dargestellt.





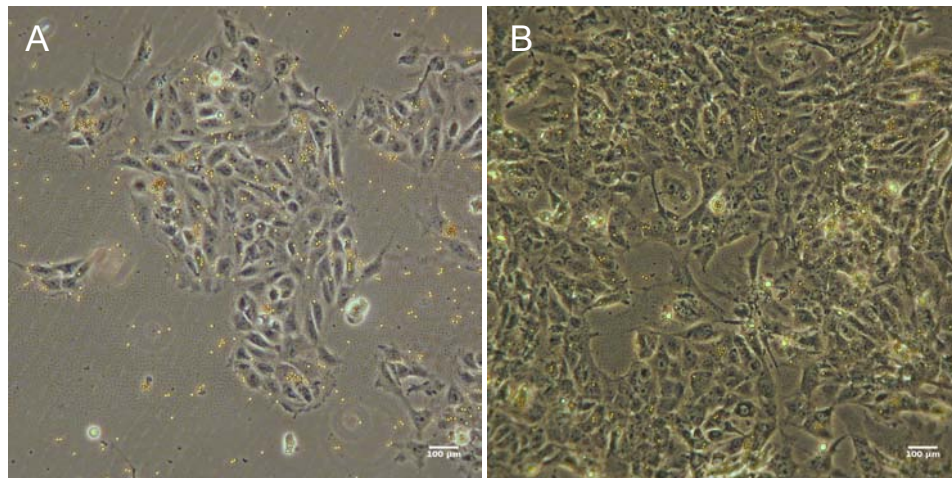
**Abbildung 3.3: FACS-Analyse von zwei embryonalen Stammzelllinien, die in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von *feeder*-Zellen vordifferenziert wurden, im direkten Vergleich**

Die Daten stammen von vier Tage alten, dissoziierten EBs, zu deren Herstellung verwendeten Zellen entweder mit *feeder* (siehe Abschnitt 2.10.5.1) oder ohne *feeder* kultiviert wurden. Beim entfernen von *feeder*-Zellen aus der ES-Zellkultur bleibt eine Schale zurück, die sowohl *feeder* als auch ES-Zellen enthält. Die Zellen aus dieser Schale dienten der Herstellung von EBs, die in Anwesenheit von *feeder*-Zellen vordifferenziert wurden.

vordifferenzieren ES-Zellen betrug jedoch bis über 50 %.

### 3.1.2 Isolation Flk-1 positiver Zellen mit Hilfe von *magnetic beads*

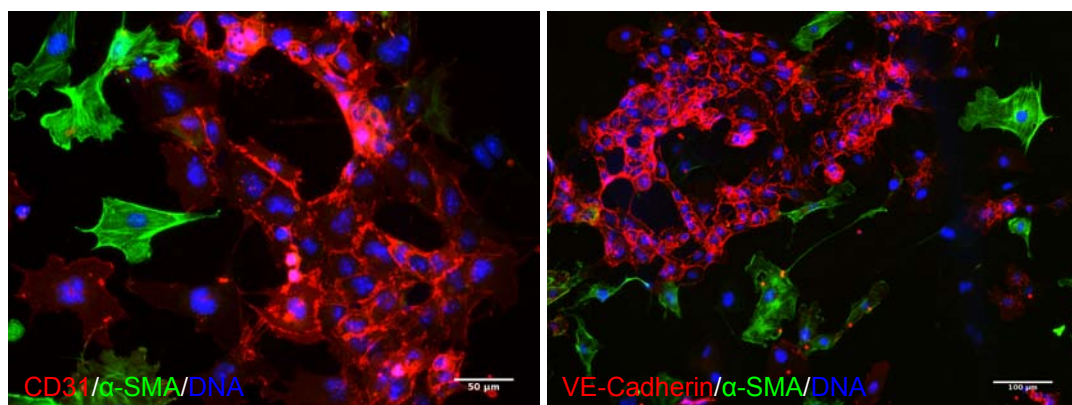
Für die Isolation von Flk-1 positiven Zellen mit Hilfe von *magnetic beads* (Abschnitt 2.10.5.2) wurden vier Tage alte EBs verwendet, da sie zu diesem Zeitpunkt die höchste Anzahl Flk-1 positiver Zellen aufwiesen. Die isolierten Zellen zeigten die Morphologie von Endothelzellen (Abbildung 3.4) und proliferierten zu Beginn gut. Die Abbildung 3.5 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung der isolierten Zellen. Man sieht, dass die Mehrzahl der Zellen CD31 und VE-Cadherin positiv war. Es war jedoch eine Kontamination der Zellkultur mit  $\alpha$ -SMA positiven Zellen zu beobachten. In der Abbildung 3.4 A sind Zellen drei Tage nach der Isolierung gezeigt, bevor sie passagiert wurden. Schon nach der Passage



**Abbildung 3.4: Isolierte Flk-1 positive Zellen**

Die Zellen wurden mit Hilfe von *magnetic beads* isoliert. A: Zellen einen Tag nach der Isolierung, B: Zellen drei Tage nach der Isolierung.

nahm die Anzahl Flk-1 positiver Zellen dramatisch ab, wobei die Anzahl  $\alpha$ -SMA positiver Zellen stark zunahm (nicht gezeigt). Die niedrige Effizienz der mechanischen Isolation, sowie die Schwierigkeiten bei den Erhaltung und Vermehrung isolierter Zellen, haben zu der Entscheidung geführt, eine andere Methode anzuwenden.



**Abbildung 3.5: Fluoreszenzfärbung isolierter Flk-1 positiver Zellen**

Die Zellen wurden mit Hilfe von *magnetic beads* isoliert. Zwei Tage nach der Isolierung wurden die Zellen mit Methanol fixiert und gegen CD31 und VE-Cadherin gefärbt.

## 3.2 Gentechnische Herangehensweise

Mehrere Versuche, eine große Anzahl von Zellen des gewünschten Typs mit Hilfe von *magnetic beads* oder auch FACS, zu erhalten, haben gezeigt, dass dies nicht zum erhofften Erfolg führt. Zudem erfordern die genannten Methoden den Einsatz teurer Antikörper. Es wurde daher im Laufe dieser Studie entschieden, eine transgene ES-Zelllinie zu etablieren, die es ermöglichen sollte, die gewünschten Zellen mit Hilfe von Antibiotika zu isolieren.

### 3.2.1 Herstellung notwendiger Vektoren

### 3.2.2 Transfektion

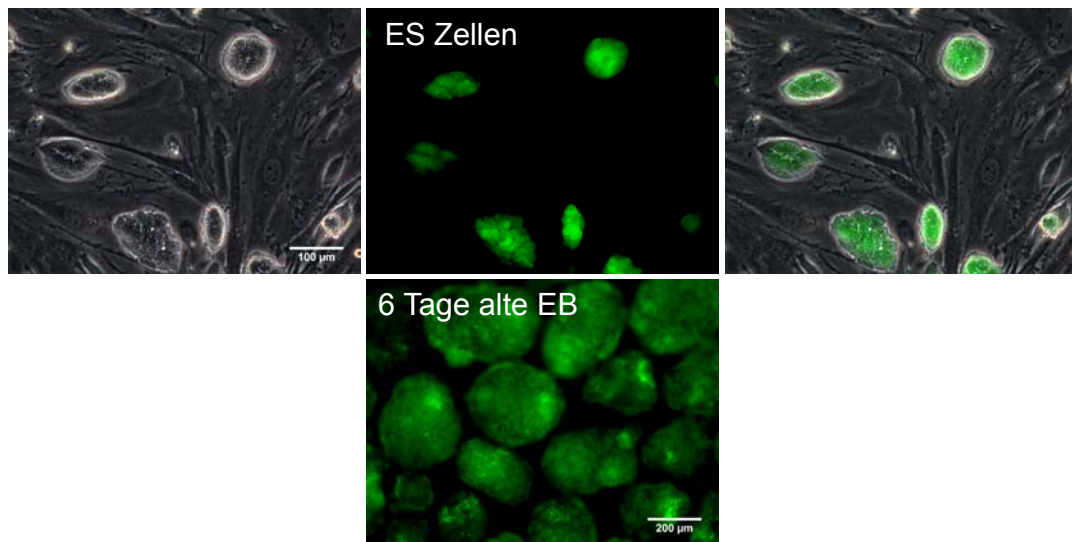
Es wurden mehrere Konstrukte für die Transfektion von ES-Zellen hergestellt (Abschnitt 2.6).

#### Transfektion von ES Zellen mit pcDNA PGK-GFP

Der Vektor pcDNA PGK-GFP (Abbildung 2.4) diente der Etablierung einer ES-Zelllinie, die konstitutiv GFP exprimieren sollte. Die Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert (Abschnitt 2.10.5.3). Für die Selektion stabil transfizierter Klone enthielt der Vektor eine aus SV40-Promoter und Hygromycin-Resistenzgen bestehende Kassette. Bei einem zuvor durchgeführten Antibiotika-Test wurde festgestellt, dass eine Hygromycin-Konzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ausreichend ist, um die Wildtyp ES-Zellen in einer Kultur innerhalb von 5 Tagen abzutöten. Die Selektion transfizierter Zellen erfolgte bei einer Hygromycin-Konzentration von 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  auf STO-Zellen. Nachdem die Kolonien stabil transfizierter und GFP exprimierender Klone groß genug gewachsen waren, wurden diese unter einem in der Sterilbank platzierten Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer GFP-Expression gepickt. Dabei wurde beobachtet, dass nicht alle selektierten Klone die GFP-Expression zeigten. Die Abbildung 3.6 zeigt die Kultur eines der gewonnenen Klone, sowie aus diesen Zellen hergestellte EBs.

#### Transfektion von ES-Zellen mit pFlk und pVE-Cad

Zur Erzeugung transgener ES-Zelllinien, die unter der Kontrolle endothelzellspezifischer Promotoren GFP und Neomycinresistenz exprimieren sollten, wurden die ES-Zellen mit

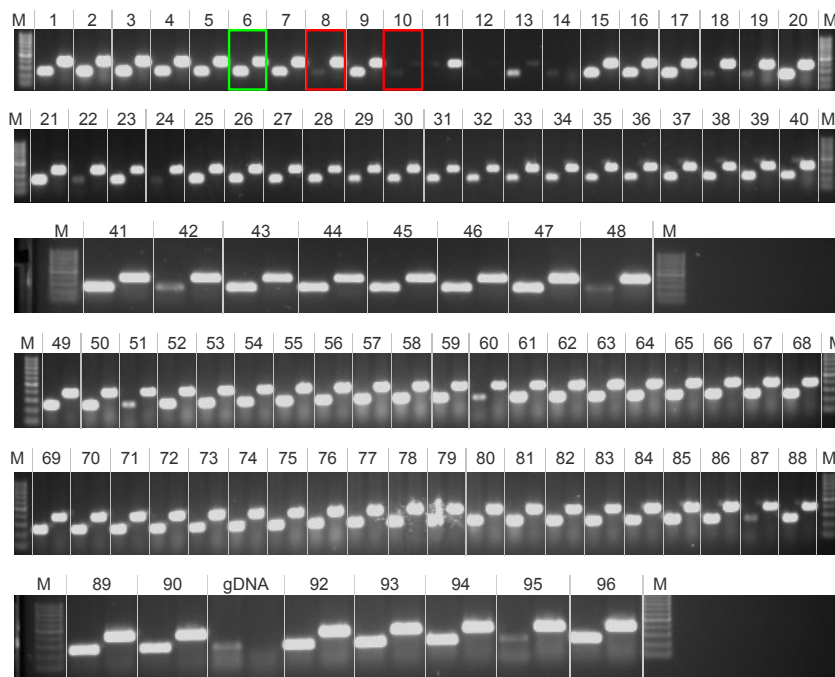


**Abbildung 3.6: Mit pcDNA PGK-GFP stabil transfizierte ES-Zellen**

Die ES-Zelllinie wurde zur Benutzung als Positivkontrolle durch stabile Transfektion mit pcDNA PGK-GFP erzeugt.

den Vektoren pFlk bzw. pVE-Cad stabil transfiziert. Die Transfektion beider Konstrukte erfolgte zur gleichen Zeit. Es wurden jeweils  $13 \times 10^6$  ES-Zellen mit den entsprechenden Vektoren durch Elektroporation transfiziert. Die Selektion erfolgte wie bei den mit pcDNA PGK-GFP transfizierten Zellen. Der Unterschied zwischen den Transfektionen mit den Vektoren, die einen konstitutiven bzw. spezifischen Promoter enthielten, bestand darin, dass man beim konstitutiven Promoter (PGK) die Expression des Transgens direkt bei nicht-differenzierten Stammzellen beobachten konnte. Wurden die Zellen hingegen mit einem spezifischen Promoter transfiziert, der erst im Laufe der Differenzierung aktiviert wird, so wird eine Differenzierung der Zellen notwendig, um die Funktion des Transgens festzustellen. Die Suche nach positiven Klonen bestand daher aus zwei Phasen: dem PCR-screen (Abbildungen 3.7 und 3.8) für den Nachweis der stabilen Integration des Transgens und dem FACS-screen (Abbildung 3.9) für den Nachweis der Funktion des Transgens.

Es wurden jeweils 96 Klone pro transfiziertem Konstrukt gepickt. Für die PCR wurde aus allen Klonen genomische DNA extrahiert und mit je 2 Primer-Paaren auf das Vorhandensein und die Vollständigkeit des Transgens untersucht. Die Abbildungen 3.7 und 3.8 zeigen, dass die meisten der gepickten Klone positiv waren. Die Primer-Paare wurden

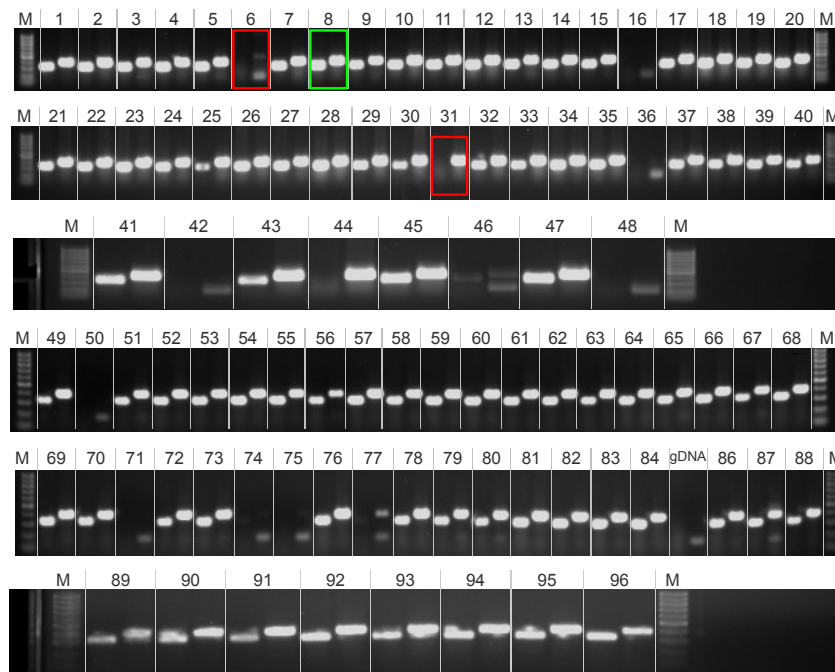


**Abbildung 3.7: PCR-screen für positive Klone der mit pFlk transfizierten ES-Zellen**

ES-Zellen wurden mit dem Vektor pFlk transfiziert und mit Hygromycin selektiert. Anschließend wurden pro Klon jeweils zwei PCRs mit zwei unterschiedlichen Primer-Paaren durchgeführt. Als Template diente aus jedem einzelnen Klon extrahierte genomische DNA. 1-96 = Klonnummer; M = Marker; gDNA = genomische DNA aus MEF als Negativkontrolle

so gewählt, dass durch eine PCR Fragmente vom Anfang und dem Ende des Transgens amplifiziert wurden. Pro Klon wurden zwei PCRs durchgeführt und die Amplikons des jeweiligen Klons nebeneinander auf ein Gel aufgetragen. Die beiden auf dem Bild durch das grüne Viereck umrandeten Banden zeigen einen Klon, der als positiv deklariert wurde. Die durch rote Vierecke umrandeten Banden sind Beispiele für als negativ deklarierten Klone. Als Negativkontrolle diente die genomische DNA, die aus primären murinen embryonalen Fibroblasten extrahiert wurde. Der PCR-screen wurde dem FACS-screen vorgeschaltet, um die Anzahl von negativen Klonen vom dem aufwändigeren FACS-screen zu minimieren. Mit der PCR konnten jedoch nur 14 Klone bei mit pFlk transfizierten Zellen und 11 Klone bei mit pVE-Cad transfizierten Zellen ausgeschlossen werden.

Es wurden zunächst die mit pFlk transfizierten Zellen mit Hilfe von FACS auf funktionierendes Transgen getestet. Die ES-Zellen wurden auf 6-Loch Platten vordifferenziert.



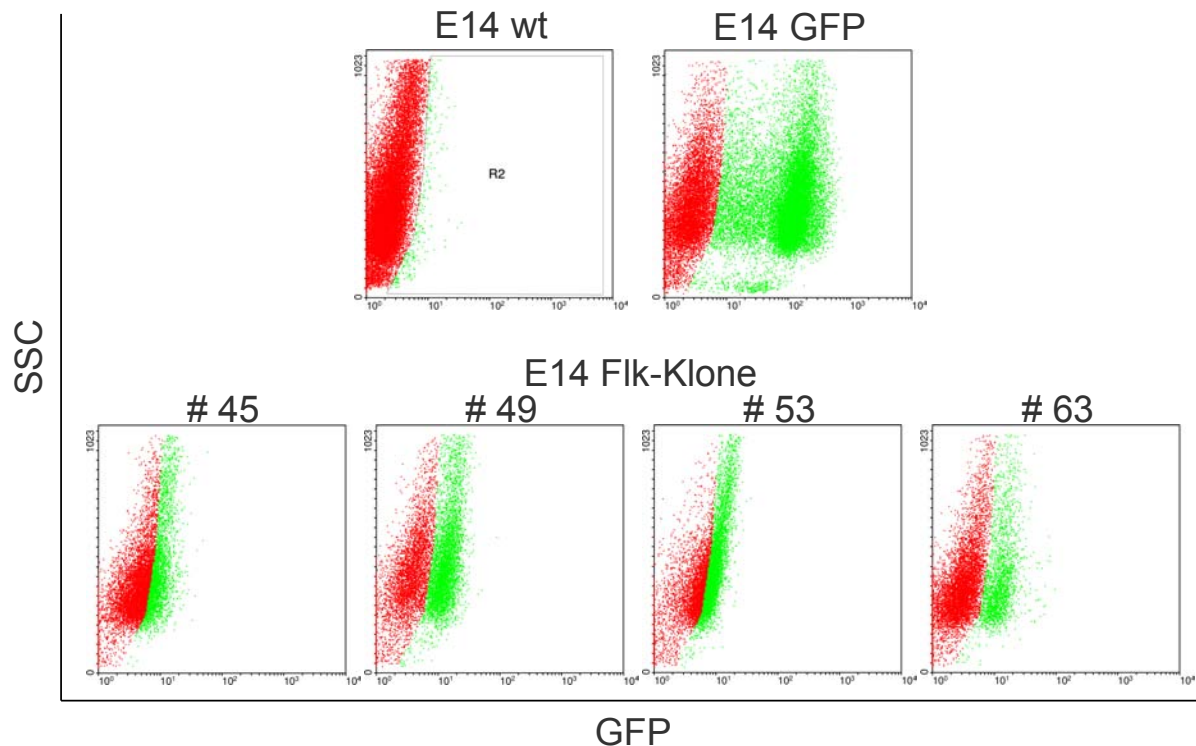
**Abbildung 3.8: PCR-screen für positive Klone der mit pVE-Cad transfizierten ES-Zellen**

ES-Zellen wurden mit dem Vektor pVE-Cad transfiziert und mit Hygromycin selektiert. Anschließend wurden pro Klon jeweils zwei PCRs mit zwei unterschiedlichen Primer-Paaren durchgeführt. Als Template diente aus jedem einzelnen Klon extrahierte genomische DNA. 1-96 = Klonnummer; M = Marker; gDNA = genomische DNA aus MEF als Negativkontrolle

Die EB Herstellung erfolgte unter ständigem Schütteln auf 6-Loch Platten für Suspensionskultur. Von den durch PCR als positiv befundenen Klonen wurden 48 für den FACS-screen verwendet. Parallel zu den Klonen wurden EB aus Wildtyp ES-Zellen und aus mit pcDNA PGK-GFP transfizierten ES-Zellen als Negativ- bzw. Positivkontrolle hergestellt. Vier Tage alte EBs wurden dissoziiert und mit Hilfe von Durchflußzytometrie analysiert (Abbildung 3.9). Es wurden vier Klone nachgewiesen, die Anzeichen einer GFP Expression zeigten. Mikroskopische Untersuchungen konnten jedoch keine klar erkennbare GFP Expression bei den als positiv getesteten Klonen zeigen, noch konnten keine GFP exprimierende vaskuläre Strukturen beobachtet werden. Weitere FACS-Analysen, bei denen die Zellen aus EBs transfizierter Klone zusätzlich mit einem anti Flk-1 Antikörper gefärbt wurden, zeigten keine Coexpression von Flk-1 und GFP (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Abbildung 3.10 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung eines der Klone, dessen 8



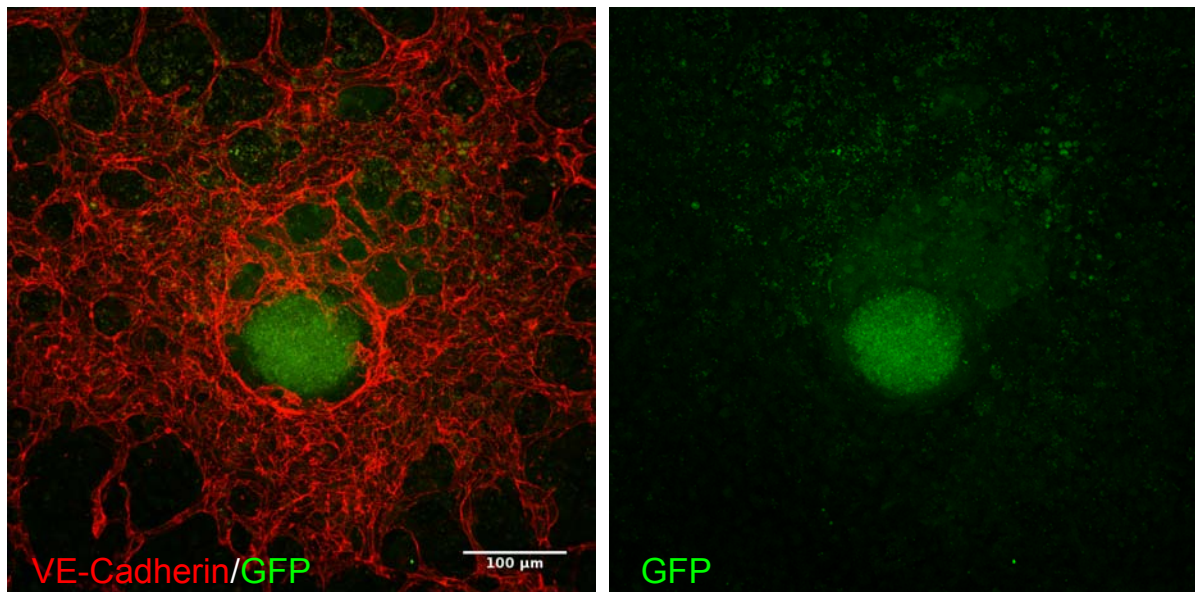


**Abbildung 3.9: FACS-screen nach positiven Klonen mit pFlk transduzierter ES-Zellen**

Screen nach GFP exprimierenden Klonen unter Verwendung der Durchflusszytometrie. Vier Tage alte EBs aus Zellen von 48 mit pFlk transfizierten und vorselektierten ES-Zellklone, sowie aus Wildtyp ES-Zellen und mit pcDNA PGK-GFP transfizierten ES-Zellen wurden auf die GFP Expression hin mit einander verglichen. Die Klon Nummer: 45, 49, 53 und 63 zeigten dabei Anzeichen von GFP Expression.

Tage alte EBs 7 weitere Tage auf einer Schale kultiviert wurden. Die EBs wurden gegen VE-Cadherin und GFP gefärbt. Man sieht stark ausgeprägte vaskuläre Strukturen. Was man hingegen bei der GFP Färbung sieht, ist die Eigenfluoreszenz des Gewebes. Es ist keine GFP Expression nach 15 Tagen Differenzierung zu beobachten.

Transfektion von ES-Zellen im Zusammenhang mit spezifischen Promotoren lieferte niedrige Effizienz und keine persistente Transgenexpression. Es ist theoretisch möglich, Klone mit funktionierendem Transgen durch Transfektion zu erhalten. Es wurde erwogen, entweder weitere Transfektionen durchzuführen und noch mehr Klone zu picken, wobei jedes Mal die gleiche Prozedur bevorstehen würde, würde man eine weitere rekombinante Zelllinie benötigen, oder nach einer weiteren Methode zu suchen.



**Abbildung 3.10: Immunfluoreszenzfärbung des E14Flk Klons Nr. 45**

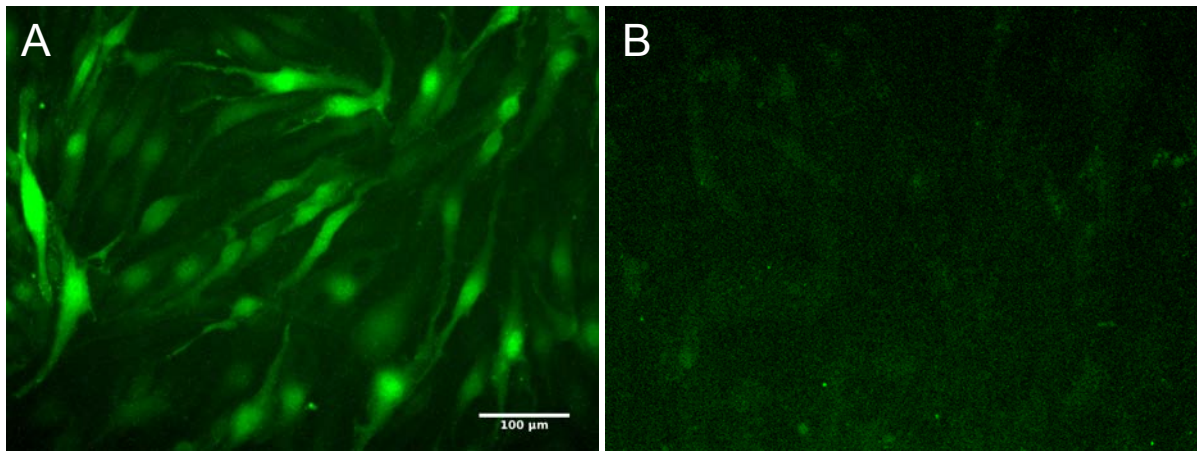
Die Zellen des Klons Nr. 45 wurden zunächst 8 Tage in Suspension und weitere 7 Tage auf einer Schale differenziert. Die Färbung gegen VE-Cadherin wurde durchgeführt, um die räumlich identische Expression von GFP und eines der für Endothelzellen spezifischen Markers zu überprüfen.

### 3.2.3 Transduktion

Bei der lentiviralen Transduktion handelt es sich um eine weitere Methode, die gewählt wurde, um eine transgene Zelllinie zu erhalten, die unter der Kontrolle eines spezifischen Promoters ein Resistenz- und ein Reportergen exprimiert. Zunächst wurde ein lentivirales Konstrukt generiert. Als Vorlage diente der Vektor pGZ-CMV (Abbildung 2.5) wobei der CMV-Promoter durch den Flk-1-Promoter ersetzt wurde und der Promoter-Enhancer eingefügt wurde (Vektor pGZ-Flk, Abbildung 2.6). Zum Testen wurden zunächst Maus-Endotheliumazellen mit dem Konstrukt transduziert. Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, dass transduzierte Zellen GFP unter der Kontrolle des Flk-1-Promoters exprimieren, wobei eine sehr hohe Effizienz der Transduktion zu verzeichnen war. Nahezu alle Zellen zeigten GFP-Expression (Abbildung 3.11 A). Parallel zu diesem Versuch wurden zum Nachweis der Spezifität des Flk-1-Promoters MEFs transduziert. Die Abbildung 3.11 B zeigt, dass hierbei keine GFP-Expression beobachtet werden konnte.

Der Vektor pGZ-CMV sollte als Positivkontrolle bei der Transduktion von ES-Zellen





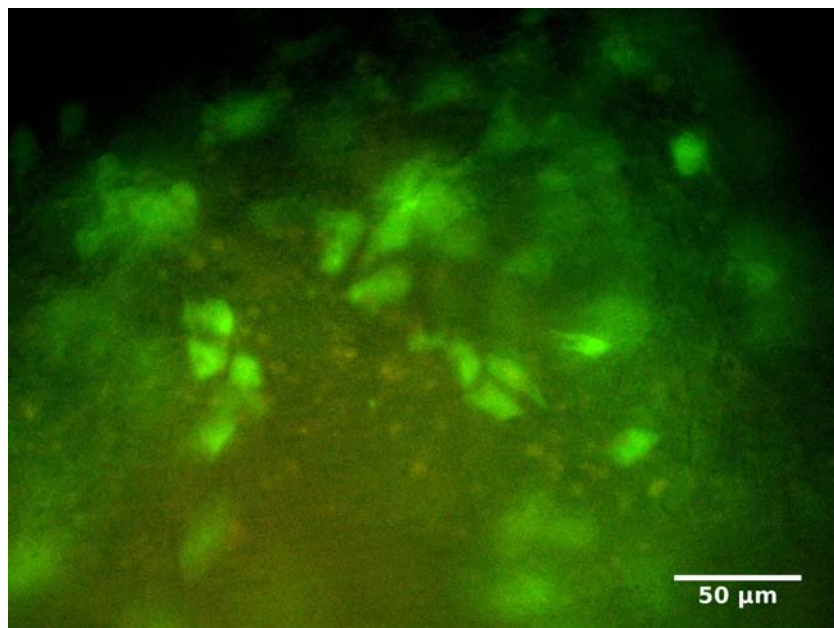
**Abbildung 3.11: Mit pGZ-Flk Konstrukt enthaltenden viralen Partikeln infizierte Endotheliazellen und MEF**

pGZ-Flk Konstrukt wurde durch Infizierung von Endotheliazellen auf seine Funktionalität geprüft (Bild A). Seine Spezifität wurde durch die Infizierung von MEF überprüft (Bild B).

dienen. Vorversuche haben jedoch ergeben, dass mit pGZ-CMV transduzierte ES-Zellen keine GFP-Expression zeigten. Es wurde daher ein Konstrukt hergestellt, bei dem der CMV-Promoter durch den PGK-Promoter ersetzt wurde (nicht gezeigt). Ein weiteres Problem, das in Betracht gezogen werden musste, war die Tatsache, dass das lentivirale Konstrukt kein Resistenzgen für die Vorselektion transduzierter ES-Zellklone enthielt. Daher wurde ein Versuch unternommen, eine Cotransduktion mit einem PGK-DsRed Konstrukt durchzuführen. Dabei würden die so erhaltenen rekombinanten ES-Zelllinien konstitutiv DsRed und die im Laufe der Differenzierung entstehende Endothelzellen GFP exprimieren. Der Versuch führte jedoch zu keinem brauchbaren Ergebnis. Die Transduktionseffizienz war zu niedrig. Um das Problem zu beseitigen, wurde für die Transduktion Polybrene (Davis et al. 2004) eingesetzt. Die Endkonzentration von Polybrene während der Transduktion betrug  $8 \mu\text{g/ml}$ . Eine Infektion von ES-Zellen mit dem PGK-GFP Konstrukt enthaltenden viralen Partikeln lieferte eine nahezu 100%ige Effizienz. Mit dem Erreichen einer hohen Transduktionseffizienz fiel auch die Notwendigkeit einer Vorselektion weg. Es wurden schließlich nur 2000 ES-Zellen mit dem pGZ-Flk Konstrukt transduziert und zwei Mal 96 Klone gepickt. Die Transfektion von ES-Zellen hat gezeigt, dass ein PCR-screen ineffektiv ist, da dadurch nur wenige Klone ausgeschlossen werden konnten. Der aufwändige FACS-screen führte letztendlich ebenfalls zu keinem positiven

Ergebnis. Es stellte sich daher die Frage, wie die Klone direkt nach dem funktionierenden Transgen durchsucht werden können. Durch die Herstellung von EBs war es möglich, die ES-Zellen mit guten Ergebnissen in Richtung Flk-1-positiver Zellen zu differenzieren. Dessen Herstellung wurde jedoch bisher auf 10 cm Schalen, höchstes auf 6-Lochplatten auf einem Schüttler durchgeführt, wobei es einer verhältnismäßig großen Menge Medium bedarf, um die suspendierten Zellen ständig in Bewegung zu halten. Die Differenzierung von fast 200 Klonen zur gleichen Zeit mit der bisher angewandten Methode würde einen sehr hohen Medium- und Platzbedarf nach sich ziehen. Daher wurde entschieden, den Versuch in 96-Lochplatten durchzuführen. Zur Herstellung der EBs wurden die Platten mit polyHEMA beschichtet, eine Substanz, die das Anheften von Zellen komplett unterbindet. Nach vier Tagen in Suspension wurden die Klone auf die GFP-Expression hin unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Abbildung 3.12 zeigt die Aufnahme eines EBs, in dem GFP-exprimierende Zellen deutlich zu erkennen sind.

Für weitere Tests wurden die GFP-exprimierenden EBs aus den 96-Lochplatten in mit Gelatine beschichtete 12-Lochplatten überführt, wo sie zum Anwachsen einige weitere

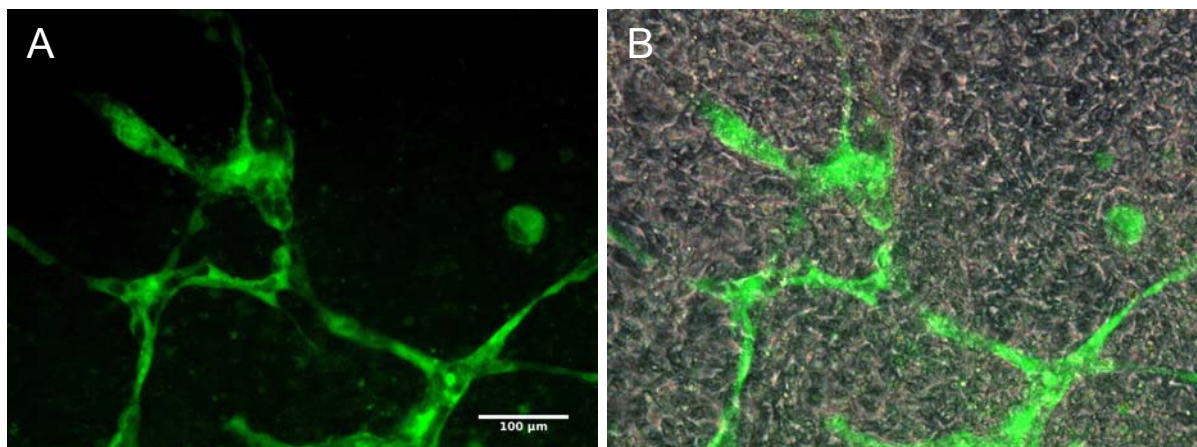


**Abbildung 3.12: Visueller Screen**

Die Abbildung zeigt ein 4 Tage altes EB eines der mit pGZ-Flk transduzierten Klone. Einzelne, GFP-exprimierende Zellen sind deutlich erkennbar.

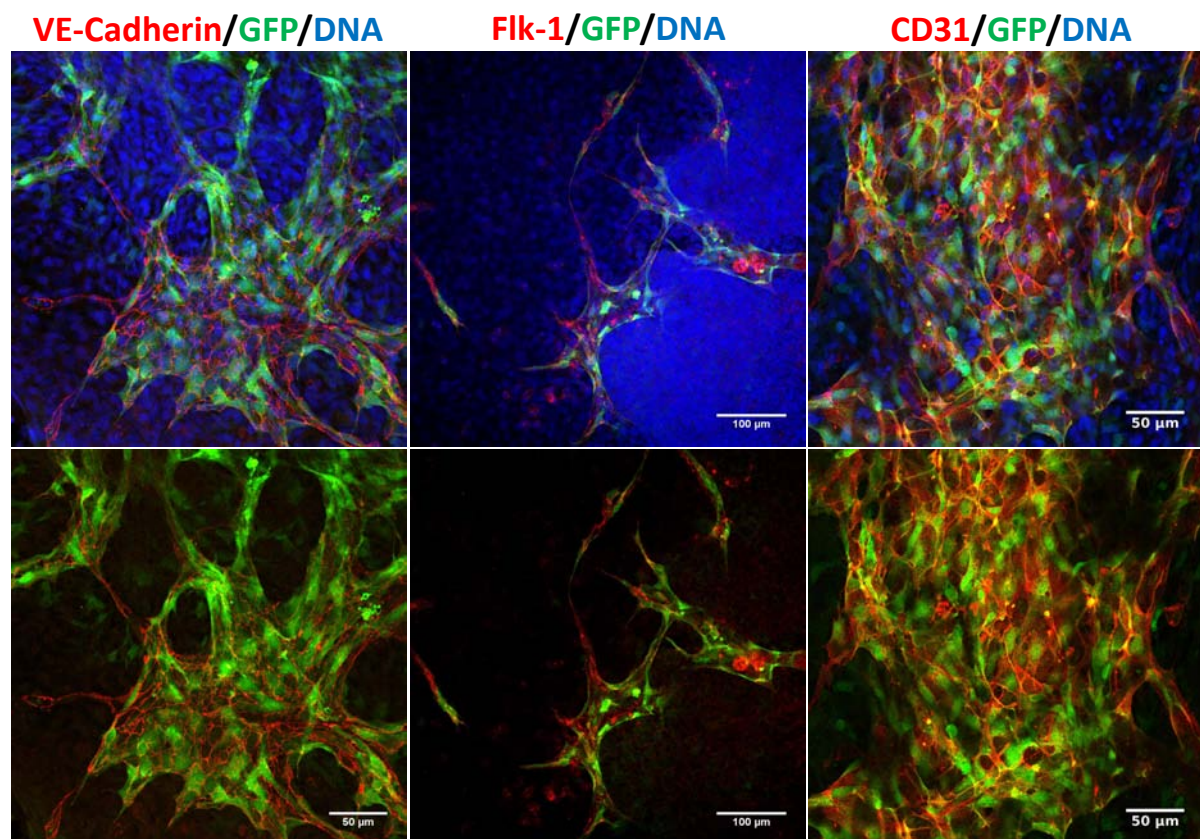
Tage kultiviert wurden. Es wurden 48 Klone auf die 12-Lochplatten überführt. Einige von diesen Klonen zeigten dann letztendlich nach einer zehntägigen Differenzierung GFP-exprimierende vaskuläre Strukturen (Abbildung 3.13). Durch das Übereinanderlagern der Hellfeld- mit der Fluoreszenzaufnahme (Abbildung 3.13 B) wird auch sichtbar, dass GFP-Expression nur auf die vaskulären Strukturen beschränkt ist, aber auch, dass bei der Differenzierung nur wenige Zellen zur Ausbildung der oben genannten Strukturen beitragen. Von den 48 Klonen, deren EBs zum Anwachsen genommen wurden, wurden schließlich 24 Klone für weitere Untersuchungen aufgehoben.

Als nächstes wurde mit einer immunologischen Färbung die Colokalisation der GFP-Expression und der Expression endothelzell-spezifischer Marker untersucht. Die Abbildung 3.14 zeigt eine Färbung von VE-Cadherin, Flk-1, CD31 neben der Färbung von GFP eines der Klone 15 bis 17 Tage nach dem Beginn der Differenzierung. Es ist klar zu erkennen, dass die Expression von GFP räumlich nur mit der Expression spezifischer Marker zusammenhängt.



**Abbildung 3.13: GFP-exprimierende vaskuläre Strukturen**

Mit pGZ-Flk transduzierte, differenzierende ES-Zellen zeigen GFP-exprimierende vaskuläre Strukturen



**Abbildung 3.14:** Untersuchung der räumlichen Verteilung der GFP-Expression bzw. der Expression endothelzell-spezifischer Marker einer etablierten Zelllinie. Mit pGZ-Flk Konstrukt transduzierte ES-Zellen wurden differenziert und gegen GFP, VE-Cadherin, Flk-1 und CD31 gefärbt.



## 4 Diskussion

Die embryonalen Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. Die Etablierung einer murinen ES-Zellkultur gelang zum ersten Mal 1981 (Evans und Kaufman 1981; Martin 1981). Seit ihrer Entdeckung ist die Erforschung dieser Zellen mit der Hoffnung verbunden, sie für medizinische Zwecke einzusetzen. Diese Hoffnung beruht auf zwei einzigartigen Fähigkeiten, die die embryonalen Stammzellen von allen anderen Zelltypen unterscheiden. Sie können unbegrenzt lange Zeit in Kultur gehalten und als reine Populationen undifferenzierter Zellen expandiert werden. Die ES-Zellen sind pluripotent und besitzen daher die Fähigkeit jeden beliebigen Zelltyp im Körper zu generieren (Keller 2005). Diese Besonderheiten der ES-Zellen haben jedoch bis jetzt auf Grund ihrer Tumorigenität ihren breiten therapeutischen Einsatz verhindert. Eine Transplantation undifferenzierter Stammzellen führt unweigerlich zur Entstehung von Teratomen. In den vergangenen 30 Jahren wurden zahlreiche Methoden entwickelt, embryonale Stammzellen zu einem breiten Spektrum verschiedener Zelltypen unter bestimmten Kulturbedingungen zu differenzieren. Dies eröffnet die Möglichkeit, ES-Zellen *in vitro* zu einem bestimmten Zelltyp zu differenzieren und für therapeutische Zwecke, zur Zeit nur in Tiermodellen, einzusetzen. Während der Differenzierung entstehen in der Kultur Zellen aller Keimblätter. Unter bestimmten Kulturbedingungen ist es möglich, die Anzahl der Zellen des gewünschten Typs zu erhöhen. Es ist jedoch noch nicht gelungen, ES-Zellen in Kultur in Richtung eines einzigen bestimmten Zelltyp zu differenzieren. Es gilt daher, die gewünschten Zellen vor der Anwendung zu isolieren und vor allem von undifferenzierten Zellen zu trennen.

## 4.1 Embryonale Stammzellkultur

Die ES-Zellkultur allein stellt schon eine Herausforderung dar. Bei den ES-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie. Im Gegensatz zu Primärzellen, die aus Geweben isoliert, für die Dauer der Versuche in Kultur gehalten und anschließend verworfen werden, wird eine Zelllinie kontinuierlich fortgeführt. Dies erfordert einen höheren Aufwand hinsichtlich der Reinhaltung der Kultur. So hat zum Beispiel zu Beginn eine massive Mycoplasmenkontamination einer ES-Zelllinie die Arbeit behindert. Dies hatte zur Folge, dass alle Zellen verworfen werden mussten und eine andere ES-Zelllinie genommen wurde. Ein weiteres Problem ist die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der ES-Zellen. Diese wurden in Anwesenheit von LIF auf einer Einzelschicht aus MEFs kultiviert. Die ES-Zellen bilden dabei runde, dicht gepackte Kolonien aus. Werden sie zu groß, können die Zellen im Inneren der Kolonien nicht ausreichend mit LIF versorgt werden und fangen an, zu differenzieren. Daher müssen sie alle zwei bis drei Tage passagiert werden. Ein weiteres mit der Kultivierung der ES-Zellen verbundenes Problem ist die Kokultur mit den *feeder*-Zellen, was in Verbindung mit humanen ES-Zellen die therapeutische Anwendung unmöglich macht. Es gibt viele Methoden der *feeder*-freien und sogar Serum-freien Kultur (Amit et al. 2004; Tremml et al. 2008), sowohl für humane als auch für murine Stammzellkulturen. Die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der ES-Zellen ist unter solchen Bedingungen jedoch noch problematischer und die Kultivierung an sich teuer.

## 4.2 Differenzierung

Das Ziel dieser Arbeit war, eine robuste Methode zu entwickeln, eine große Anzahl Endothel(vorläufer)zellen mit hoher Reinheit von murinen embryonalen Stammzellen abzuleiten. Die abgeleiteten Zellen sollten dann für *in vivo* Studien im Tiermodell der pulmonalen Hypertonie eingesetzt werden.

Als theoretische Grundlage für die Differenzierung diente zu Beginn der Arbeit das von McCloskey et al. (2006) publizierte Protokoll. Das Protokoll beschreibt die Isolierung teilungsfähiger Endothelzellen über sukzessive Schritte der Kultivierung von ES-Zellen zunächst in Abwesenheit von *feeder*-Zellen, über deren anschließende Kultur auf Collagen IV beschichteten Schalen in Abwesenheit von LIF, mit folgender Isolierung Flk-1-positiver

Zellen mittels FACS und deren erneute Kultivierung auf Collagen IV beschichteten Schalen. Schließlich wurden Zellcluster anhand ihrer endothelzell-typischen Morphologie manuell von anderen Zellen getrennt. Ein zwei Jahre später publiziertes, sehr ähnliches Protokoll (Blancas et al. 2008) versprach sogar eine 25-fache Populationsverdoppelung isolierter Zellen. Trotz dieser veröffentlichten Ergebnisse über die Etablierung einer Endothelzellkultur aus Serum stimulierten murinen ES-Zellen hat diese Methode keine breite Anwendung für die routinemäßige Isolierung der Endothelzellen erfahren. Vermutlich basiert dieser Erfolg auf einer bestimmten Serumcharge (Murry und Keller 2008). Viele Forschungsgruppen weltweit arbeiten derzeit an der Etablierung der murinen Endothelzellkultur mit wenig Erfolg. Dies liegt daran, dass im Gegensatz zu den von humanen ES-Zellen abgeleiteten Endothelzellen (Levenberg et al. 2010) isolierte murine Endothelzellen in Kultur nicht erhalten werden können. Sie proliferieren nicht, werden seneszent oder von Fibroblasten überwachsen oder, was noch unklar ist, zu solchen transdifferenzieren. Die Anwendung des Protokolls von McCloskey et al. (2006) während der Anfertigung dieser Arbeit scheiterte schon an der Erzeugung einer großen Anzahl Flk-1-positiver Zellen. Parallel dazu wurde damit begonnen, die Generierung Flk-1-positiver Zellen durch EB-Erzeugung zu bewerkstelligen, was zu Beginn mit Problemen bezüglich der Reproduzierbarkeit behaftet war. Durch einen zusätzlichen Schritt beim Differenzierungsvorgang ist es letztendlich gelungen, einen hohen Anteil Flk-1-positiver Zellen (durchschnittlich 40%) zu generieren (Abbildung 3.2). Endothelzellen und ihre Vorläufer entstehen während der Differenzierung spontan und früh. Die Durchflusszytometrie-Analyse zeigte, dass die größte Anzahl Flk-1-positiver Zellen am vierten Tag der EB-Generierung zu beobachten war (Abbildung 3.1), und deren Anzahl im weiteren Verlauf abnahm. Dies kann dadurch erklärt werden, dass während der embryonalen Entwicklung die Flk-1-Expression einen Punkt markiert, an dem die Zellen mesodermalen Ursprungs unterschiedliche Entwicklungsrichtungen einschlagen, in deren Verlauf die Flk-1-Expression, die Endothelzellen ausgenommen, wieder eingestellt wird. Aus dem Flk-1-positiven Mesoderm können sich Zellen der hämatopoetischen, vaskulären Linie (Choi et al. 1998) oder sich zu Kardiomyozyten (Kattman et al. 2011) beziehungsweise Skelettmuskelzellen (Le Grand et al. 2004) entwickeln. Da die Endothelzellen neben einer großen Anzahl anderer Zelltypen entstehen, gilt es, sie von ihnen zu trennen. Die von murinen ES-Zellen abgeleitete Endothelzellen haben sich jedoch als besonders empfindlich erwiesen. Darüber hinaus wachsen sie langsamer als viele andere Zelltypen.

## 4.3 Isolation von Zellen

Trotz beachtlicher Fortschritte, die Differenzierung von ES-Zellen in bestimmte Richtungen zu lenken, ist es für die meisten Anwendungen notwendig, die Zellen des erwünschten Typs aufzureinigen.

Spezifische Oberflächenmarker werden im Allgemeinen dazu verwendet, den benötigten Zelltyp zu isolieren oder die unerwünschten Zellen zu entfernen. FACS wurde bereits mehrfach verwendet, um unterschiedliche von ES-Zellen abgeleitete Zelltypen, wie hämatopoetische, mesodermale Vorläufer- und endotheliale Zellen (Gadue et al. 2006; Kattman et al. 2006; Kouskoff et al. 2005; Wang et al. 2004) zu isolieren. FACS bietet die Möglichkeit, mehrere Oberflächenmarker gleichzeitig zu analysieren und somit die Selektion der gewünschten Subpopulation zu verfeinern. Der größte Nachteil von FACS ist sein relativ niedriger Durchsatz. Eine verwandte Methode ist der Einsatz von *magnetic beads*. Diese Methode bietet einen höheren Durchsatz (Vodyanik et al. 2006), ist jedoch für die Nutzung mehrerer Oberflächenmarker weniger geeignet. Die Reinheit isolierter Zellen ist mit über 90% relativ hoch, liegt aber etwas unter den durch die Anwendung von FACS erreichbaren Werten. Die beim Anfertigen dieser Arbeit mit Hilfe der *magnetic beads* isolierten Flk1-positiven Zellen zeigten eine geringe Kontamination durch  $\alpha$ -SMA-positive Zellen (Abbildung 3.5), deren Anzahl im Verlauf der Kultivierung stark zunahm. Die relativ geringe Anzahl isolierter Zellen und deren schlechte Expandierbarkeit machte diese Methode nicht besonders geeignet für die Gewinnung von Endothelzellen, deren Anzahl für eine therapeutische Anwendung in einem Tiermodell ausreichen würde.

Die genetische Selektion basiert auf der Expression eines Selektionsmarkers, die von einem spezifischen Promoter kontrolliert wird. Diese Methode bietet hohe Reinheit isolierter Zellen bei ausgezeichneter Skalierbarkeit. Die Rolle eines Selektionsmarkers kann zum Beispiel ein Fluoreszenzprotein spielen, wobei die den Marker exprimierende Zellen mit Hilfe von FACS isoliert werden können. Die Verwendung eines Antibiotikaresistenzgens erlaubt die Selektion des gewünschten Zelltyps durch den Einsatz von Antibiotika. Ein Resistenzgen wurde erst zur Selektion von Kardiomyozyten verwendet (Klug et al. 1996). Bei diesem Ansatz wurde eine Reinheit der isolierten Herzmuskelzellen von über 99% erreicht. In einer weiteren Studie wurden Kardiomyozyten in einer klinisch relevanten Anzahl und Reinheit unter Verwendung eines Bioreaktors gezüchtet (Zandstra et al. 2003). Der momentan grundlegende Nachteil dieses Ansatzes ist die Notwendigkeit der



stabilen Integration der Selektionskassette in das Wirtsgenom, wobei die Gefahr der Tumorigenität gewonnener transgener Zellen erhöht wird.

## 4.4 Gentechnische Herangehensweise

Nachdem nach zahlreichen Versuchen festgestellt wurde, dass die Anwendung mechanischer Methoden für die Isolierung von Endothelzellen nicht das erhoffte Ergebnis liefert, wurde entschieden, eine embryonale Stammzelllinie zu etablieren, die es ermöglichen sollte, den gewünschten Zelltyp mit Hilfe von Antibiotika zu isolieren. Der Einsatz eines Reportergens neben einem Resistenzgen sollte die Visualisierung der Zellen in Zellkultur, aber auch später bei der Verwendung *in vivo* erleichtern.

Die Anwendung eines Reporter- bzw. Resistenzgens wurde bereits in einigen Studien beschrieben. Die Publikationen von Marchetti et al. (2002); Gimond et al. (2006) beschreiben den Einsatz des Promoters des *orphan tyrosine-kinase receptor* Tie-1 in murinen ES-Zellen, der erst spät während der Differenzierung aktiv wird und das ausdifferenzierte Endothelium kennzeichnet. In der Studie von Klug et al. (1996) wurden Cardiomyocyten unter Verwendung eines spezifischen, die Expression eines Antibiotikaresistenzgens kontrollierenden Promoters aus differenzierenden murinen ES-Zellen isoliert. Arbel et al. (2010) beschrieben die Isolierung von Cardiomyocyten aus humanen ES-Zellen, wobei hier ein spezifischer Promoter die Expression eines Reportergens kontrollierte, was eine Selektion mit Hilfe von FACS ermöglichte. In der Studie von Li et al. (1998) wurden neuronale Vorläuferzellen aus rekombinanten murinen ES-Zellen mittels Antibiotika isoliert. Die Isolierung von glatten Muskelzellen unter Einsatz von Antibiotika aus gentechnisch veränderten murinen ES-Zellen wurde von Sinha et al. (2006, 2009) beschrieben. Während in der Studie von Li et al. für die Integration des Transgens homologe Rekombination verwendet wurde, wurde in den anderen Studien das Transgen zufällig ins Genom integriert, wobei nur in der Studie von Arbel et al. die lentivirale Transduktion eingesetzt wurde. Vor diesem Hintergrund ist es leicht nachvollziehbar, dass zunächst die Entscheidung gefällt wurde, eine rekombinante ES-Zelllinie durch stabile Transfektion zu etablieren. Sie ist relativ leicht zu bewerkstelligen und hat bereits, den veröffentlichten Berichten nach, positive Ergebnisse geliefert.

#### 4.4.1 Transfektion

Der vorläufige Plan der Doktorarbeit sah vor, dass sowohl Endothel- als auch glatte Muskelzellen aus differenzierenden ES-Zellen isoliert werden sollten. Der Schwerpunkt der Arbeit lag zu Beginn auf der Isolierung der Endothelzellen, da diese eine Reihe spezifischer Oberflächenmarker aufweisen, die ohne weiteres bei der mechanischen Isolierung ausgenutzt werden können. Die Strategie für die Selektion glatter Muskelzellen sollte später entwickelt werden, da deren spezifische Marker sich ausschließlich im Zytosol und nicht auf der Zelloberfläche befinden, was die mechanische Isolierung erschwert. Es wurde unter anderem überlegt, die Zellen unter Einsatz von Saponin, dessen Wirkung reversibel ist, zu permeabilisieren und mit Hilfe der gegen zellspezifische Marker gerichteten Antikörper und FACS zu isolieren. Die Entscheidung der Etablierung transgener Zelllinien hätte also die mit der Isolierung glatter Muskelzellen verbundenen Probleme beseitigt. So wurden analog zu den Vektoren pFlk und pVE-Cad, die endothelspezifische Promotoren tragen, drei weitere spezifische Promotoren für glatte Muskelzellen enthaltenden Vektoren generiert. Die Konstrukte enthielten jeweils den SM22 $\alpha$ -Promoter (Solway et al. 1995) in zwei unterschiedlichen Längen bzw. *smooth muscle myosine heavy chain* (SMMHC)-Promoter (White und Low 1996). Die Funktion der für die Isolierung glatter Muskelzellen hergestellter Vektoren konnte mit Erfolg durch transiente Transfektion von *rat pulmonary artery smooth muscle cells* (rPASMCs) getestet werden. Im Gegensatz dazu konnte die Funktion endothelspezifischer Vektoren durch Transfektion der Maus-Endothelioma Zellen nicht nachgewiesen werden, was vermutlich mit der schlechten Transfizierbarkeit der Zellen zusammenhängt. Die erfolgreiche Transfektion von rPASMCs zeigte jedoch, dass die generierten Konstrukte prinzipiell funktionsfähig sind. Die Vektoren wurden schließlich zur Generierung von fünf unterschiedlichen stabil transfizierten ES-Zelllinien eingesetzt. Die Etablierung der ES-Zelllinien für die Isolierung glatter Muskelzellen kam jedoch nicht über den PCR-screen hinaus, da entschieden wurde, dass deren Einsatz für diese Arbeit nicht erforderlich war.

Neben Tie-1, Flk-1 und VE-Cadherin gibt es weitere endothelspezifische Marker. Das bereits erwähnte CD31, das auch als *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) bezeichnet wird (Newman et al. 1990; Vecchi et al. 1994), von-Willebrand-Faktor (vWF), P-Selectin und CD34 (Fina et al. 1990). Während die Expression von VE-Cadherin und Flk-1 nur auf das Endothelium beschränkt ist, können vWF, PECAM-1,

P-selectin und CD34 auch in Megakaryozyten, Thrombozyten und einigen anderen vorwiegend hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden (Risau 1995). PECAM-1 wird darüber hinaus auch von undifferenzierten murinen ES-Zellen exprimiert. Im Gegensatz zu Tie-1, das bereits für Antibiotikaselektion von Endothelzellen verwendet wurde (Marchetti et al. 2002; Gimond et al. 2006) und das erst später während der Differenzierung exprimiert wird, werden Flk-1 gefolgt von VE-Cadherin früher exprimiert. Mit dem Einsatz der beiden zuletzt erwähnten Promotoren sollten Zellen isoliert werden, die eher einen Vorläufer-Status haben und ihre Teilungsfähigkeit noch nicht verloren haben. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, den Differenzierungsprozess isolierter Zellen besser zu untersuchen. Damit könnte man Strategien entwickeln, um in diesen Prozess steuernd einzugreifen.

Der Schwerpunkt wurde zunächst auf die Untersuchung der mit pFlk transfizierten Klone gelegt. Durch den PCR-screen wurden nur 14 von 96 Klonen als negativ befunden. Durch die PCR kann jedoch nur die Integration der Transgens nachgewiesen werden, nicht seine Funktion. Während des PCR-screens wurden die Klone für kurze Zeit in 96-Loch Platten bei -80°C gelagert. Nach dem screen müssen alle für die Untersuchung bestimmten Klone gleichzeitig aufgetaut und vor der anschließenden Lagerung vermehrt werden. Es ist nicht möglich, einen Teil der Klone aufzutauen und die Platte dann wieder einzufrieren. Die Vermehrung der Klone fand in 6-Loch Platten statt. Es bietet sich dabei an, vor dem Einfrieren der Klone einen kleinen Anteil der ES-Zellen für die Differenzierung aufzuheben. Das Vordifferenzieren der ES-Zellen in 12-Loch Platten bereitete dabei keine Probleme, die Herstellung der EBs von 48 Klonen schon. Die routinemäßige Herstellung von EBs erfolgte in 10 cm Schalen in 15 ml Medium. Die Herstellung von EBs aus 48 Klonen gleichzeitig mit der bis dahin angewendeten Methode würde einen hohen Platz- und Mediumbedarf erfordern. Es wurde daher entschieden, die Generierung der EBs in 6-Loch Platten für Suspensionskulturen durchzuführen. Vor dem Hintergrund der anfänglichen Schwierigkeiten, während der Differenzierung von ES-Zellen die Expression von Flk-1 zu induzieren, stellte sich die Frage, ob die Verwendung der 6-Loch Platten für diesen Zweck geeignet ist. Um bei dem FACS-screen eine genaue Aussage über die Funktion des Transgens zu treffen, sollte der jeweilige Klon sowohl auf die Expression von Flk-1 als auch auf die Expression von GFP hin getestet werden, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Mit der Hoffnung, dass man doch positive Klone erhält, wurde auf die Färbung jedes einzelnen Klons mit Flk-1-Antikörpern verzichtet (hoher Bedarf an Antikörpern und Zeit) und nur auf die GFP-Expression geschaut. Der FACS-screen zeigte

vier positive Klone. Durch mikroskopische Untersuchungen der Klone konnte jedoch keine GFP-Expression beobachtet werden. Ein Western Blot (WB) zeigte eine Expression von GFP in frühen Stadien der Differenzierung. So wurde bei vordifferenzierten Zellen des Klones Nr. 45 durch WB starke GFP-Expression nachgewiesen jedoch nicht bei fünf Tage alten EBs (Daten nicht gezeigt). Zwei Faktoren könnten bei der schwachen bzw. fehlenden Expression von GFP eine Rolle gespielt haben. Das GFP-Gen befand sich im Konstrukt hinter der *internal ribosome entry site* (IRES). Die Expression der hinter der IRES-Sequenz liegenden Gene ist in der Regel niedriger als die der davor liegenden Gene. Die niedrige Aktivität des Flk-1-Promoters würde dann in einer noch niedrigeren GFP-Expression resultieren. Als zweiter Grund käme möglicherweise das epigenetische Silencing in Frage. Die Differenzierung pluripotenter Zellen geht mit den dramatischen Veränderungen des Expressionsmusters einher (Kobayakawa et al. 2007; Zhao et al. 2008; Saraiva et al. 2010). Gene, die in ES-Zellen aktiv waren, werden durch DNA- bzw. Histon-Methylierung/Deacetylierung stillgelegt, andere werden wiederum eingeschaltet. Wenn das Transgen in einen Bereich des Genoms integriert wurde, der während der Differenzierung stillgelegt wird, wird es mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht exprimiert. Veröffentlichte Studien (Marchetti et al. 2002; Gimond et al. 2006; Klug et al. 1996; Sinha et al. 2006, 2009) zeugen davon, dass eine Etablierung rekombinanter ES-Zelllinien mit funktionierendem Transgen trotz des Silencing generell möglich ist. Es wurde daher angenommen, dass das Fehlen der GFP-Expression auf die IRES-Sequenz und den schwachen Flk-1-Promoter zurückzuführen ist. Es wurden zwei weitere Vektoren hergestellt, in welchen die IRES-Sequenz durch eine T2A-Sequenz (Szymczak et al. 2004; Holst et al. 2006) ersetzt wurde. Der Einsatz von 2A-Sequenzen als eine Verbindung zwischen mehreren für Proteine kodierenden Sequenzen im selben *open reading frame* (ORF) ermöglicht durch *self-splicing* innerhalb der 2A-Sequenzen eine nahezu komplette Trennung und stöchiometrische Produktion kodierter Proteine. Die Funktion der T2A-Sequenz in generierten Konstrukten wurde durch Transfektion eines Vektors, bei dem die Expression der GFP-T2A-neo Kasette vom PGK-Promoter kontrolliert wurde, durch Western Blot verifiziert. Ein erneuter Versuch, stabil transfizierte, GFP exprimierende ES-Zellklone mit den neu hergestellten Konstrukten zu generieren, brachte keinen Erfolg. An dieser Stelle sollte ein neuer Ansatz helfen, das gesetzte Ziel zu erreichen.

#### 4.4.2 Lentivirale Transduktion von ES-Zellen

Auf Grund der niedrigen Effizienz konnte durch Transfektion keine ES-Zelllinie etabliert werden, deren Zellen im Zuge der Differenzierung endothelspezifische GFP-Expression zeigten. Dies könnte tatsächlich mit den verwendeten Promotoren zusammen hängen, denn es wurde bereits von Etablierungen der ES-Zelllinien unter Benutzung anderer Promotoren berichtet (Marchetti et al. 2002; Gimond et al. 2006; Arbel et al. 2010; Li et al. 1998). Es stellte sich nun die Frage ob der Entnahme einer größeren Anzahl transfizierter Klone mit der Hoffnung auf einen positiven Klon, oder der Verwendung einer effizienteren Methode, der lentiviralen Transduktion, die in dem Labor, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, erst einmal etabliert werden musste. Die Wahl fiel auf die Transduktion, deren Anwendung auf Anhieb positive Ergebnisse lieferte.

Einer der Gründe dafür, dass die Anwendung von Viren für den Gentransfer zunächst nicht in Betracht gezogen wurde, ist das erhöhte Sicherheitsrisiko und der damit verbundene größere Aufwand gegenüber der Anwendung nicht-viraler Gentransfermethoden. Einiges spricht jedoch für die Transduktion, vor allem durch den Einsatz von Lentiviren. Viren repräsentieren ein natürlich vorkommendes Shuttlesystem für Nukleinsäuren (Schambach et al. 2009). Der Gentransfer erfolgt dadurch viel effizienter als durch Transfektion der Zellen mit nackter DNA. Das mittlerweile gut untersuchte und optimierte lentivirale Gentransfersystem liefert eine sehr gute Transduktionseffizienz. Die Verwendung von Lentiviren ermöglicht eine stabile Integration des Transgens sogar in nicht-proliferierende Zellen (Naldini et al. 1996a), weil das virale Genom aktiv in den Zellkern transportiert wird (Follenzi et al. 2000; Zennou et al. 2000). Vor der Durchführung des Transduktionsansatzes hatte man zu bedenken, dass mit transduzierten Transgenen das gleiche wie mit transfizierten passieren könnte, das heißt: keine stabile Expression während und nach der Differenzierung. Der retrovirale Gentransfer wurde zu Beginn der Etablierung dieser Methode durch transkriptionelles Silencing erschwert. Es hatte sich herausgestellt, dass Promoter- und Enhancer-Sequenzen retroviraler *long-terminal-repeats* (LTRs) in der Wirtszelle Faktoren in Gang setzen, die die Expression viraler Gene unterdrücken (Jähner et al. 1982; Jähner und Jaenisch 1985). Des Weiteren verursachen auch die nicht akut transformierenden Retroviren Krebs durch Insertionsonkogenese (Rosenberg und Jolicoeur 1997; Fan et al. 2010). Sie integrieren vorzugsweise in der Nähe von Stellen, an welchen die Transkription beginnt, ins Wirtsgenom (Mitchell et al. 2004) und können

somit durch Insertionsaktivierung, bei welcher die Promoter/Enhancer-Aktivität der LTRs eine Rolle spielt, die Expression zellulärer Protoonkogene einschalten (Hayward et al. 1981). Die Lentiviren stellen hier jedoch eine Ausnahme dar. Sie werden als weniger tumorigen angesehen, da sie vorzugsweise innerhalb von Genen und nicht in der Nähe ihrer Promotoren integrieren (Schröder et al. 2002). Darüber hinaus hat die Entwicklung von *self-inactivating* (SIN) Vektoren (Zufferey et al. 1998; Miyoshi et al. 1998) durch das Entfernen der Promoter/Enhancer-Aktivität des 3'-LTR die Gefahr einer Aktivierung von Protoonkogenen so wie des transkriptionellen Silencing minimiert. Das Entfernen des viralen Promoters macht die Nutzung anderer Promotoren innerhalb eines SIN-Vektors für die Kontrolle der Transgenexpression notwendig, was wiederum die Gefahr des Silencing minimiert. Seit der Entwicklung der Methode des viralen Gentransfers, arbeitet man an seiner Optimierung. Es wird sowohl an der Verbesserung der Effizienz als auch an der höheren Sicherheit gearbeitet. Ein weiteres Anliegen bei diesen Bemühungen ist die Sicherstellung der Langzeitexpression des Transgens. Eine Reihe konstitutiver Promotoren wurden bereits im Hinblick auf die Persistenz der durch sie kontrollierten Expression in embryonalen Stammzellen untersucht (Chung et al. 2002; Ward und Stern 2002; Hong et al. 2007). Bei der Verwendung des CMV-Promoters (Chung et al. 2002; Hong et al. 2007; Zeng et al. 2003; Kim et al. 2007) wurde festgestellt, dass dieser Promoter sich nicht für die Kontrolle der Transgenexpression in undifferenzierten ES-Zellen eignet. Dies korreliert mit dem Ergebnis der Transduktion von ES-Zellen mit dem den CMV-Promoter enthaltenden Ausgangsvektor pGZ-CMV im Rahmen dieser Arbeit. Es konnte nur eine sehr schwache GFP-Expression in einzelnen ES-Zellen beobachtet werden. Das führte zunächst zu der Annahme einer niedrigen Transduktionseffizienz in ES-Zellen. Das Ergebnis stand jedoch in keinem Verhältnis mit der Transduktion von Endothelioma-Zellen mit pGZ-Flk, wo sich eine sehr hohe Effizienz des Gentransfers zeigte. Ein Austausch des CMV-Promoters durch den PGK-Promoter im pGZ-CMV zeigte auch, dass die Transduktion von ES-Zellen eine nahezu 100%ige Effizienz lieferte (Daten wurden nicht gezeigt). Die hohe Transduktionseffizienz wird bei dem Einsatz von Lentiviren, deren Wildtyp Hüllproteine nur einen eingeschränkten Tropismus aufweisen und keine Lentivector Präparationen mit hohem Titer erlauben, durch die Verwendung von Glykoproteinen anderer Viren erreicht. Dieser Prozess wird als Pseudotypisierung bezeichnet (Escors und Breckpot 2010). Bei der Anfertigung dieser Arbeit wurde eine sonst oft verwendete Pseudotypisierung mit dem nahezu ubiquitär infektiösen Glukoproteins

des Vesicular stomatitis virus (VSV-G) (Yang et al. 1995; Burns et al. 1993) eingesetzt. Die Verwendung von Polybrene (Seitz et al. 1998; Davis et al. 2004) hat die Effizienz der Transduktion nochmals um ein Vielfaches gesteigert.

Der Einsatz zellspezifischer Promotoren ist ebenfalls vorteilhaft, da sie weniger anfällig für die Inaktivierung sind und die Wahrscheinlichkeit, dass sie die Verteidigungsmechanismen der Wirtszelle in Gang setzen, als geringer eingeschätzt wird (Liu et al. 2004). Eine verbesserte Stabilität und Persistenz der Expression ist daher zu erwarten. Bislang wurde die spezifische Genexpression in vielen Zelltypen untersucht, unter anderem auch in Endothelzellen (De Palma et al. 2003). Die Abbildung 3.14 zeigt die Aufnahmen einer etablierten ES-Zelllinie, deren Zellen für 15 bzw. 17 Tage differenziert wurden. Wie bei den in Abbildung 3.13 gezeigten GFP-exprimierenden vaskulären Strukturen nach einer zehntägigen Differenzierung konnten auch nach 17 Tagen bei lebenden Zellen deutlich sichtbare vaskuläre Strukturen beobachtet werden. Es ist daher zu erwarten, dass durch die lentivirale Transduktion eine persistente Transgen-Expression in differenzierenden ES-Zellen erreicht wurde.

## 4.5 Ausblick

Eine reine Endothelzellkultur aus den gewonnenen ES-Zelllinien wurde zwar noch nicht etabliert, jedoch eröffnen diese Zelllinien im erreichten Stadium viele Möglichkeiten. So wird eine unter der Kontrolle des Flk-1 Promoters GFP exprimierende ES-Zelllinie bereits in einem anderen Labor eingesetzt. Dort werden diese Zellen mit Tumorzellen kokultiviert, um die Vaskularisierung des Tumorgewebes durch aus den differenzierenden ES-Zellen stammenden Endothelzellen zu untersuchen. Die spezifische GFP-Expression hilft dabei, die Zellen eindeutig zu identifizieren. Des Weiteren kann man die Entstehung Flk-1 exprimierender Zellen direkt beobachten, ohne diese fixieren zu müssen. Durch die mit der GFP-Expression einhergehende Antibiotikaresistenz kann man effizienter an der Optimierung der Kulturbedingungen arbeiten, um die Aufrechterhaltung der isolierten Zellen zu verbessern.

## Definierte Kulturbedingungen

Die Erfahrungen, die im Zuge der Anfertigung dieser Arbeit gesammelt wurden, zeigen, dass die Kultivierung der ES-Zellen, sowie deren Differenzierung unter definierten Bedingungen für eine gute Reproduzierbarkeit unabdingbar ist. Wie bereits erwähnt, wurde von einer Serum- und *feeder*-freien Kultur der Stammzellen zunächst abgesehen. Da unter diesen Bedingungen der undifferenzierte Zustand von ES-Zellen bei größerem Aufwand schwieriger zu gewährleisten ist.

Die essenzielle Rolle der *feeder*-Zellen bei der Kultivierung von embryonalen Stammzellen besteht in der Unterstützung derer Selbsterneuerung. Durch die Zugabe von LIF ins serumhaltige Kulturmedium kann der undifferenzierte Zustand einiger ES-Zelllinien auch in Abwesenheit von *feeder*-Zellen aufrecht erhalten werden (Smith et al. 1988; Williams et al. 1988). Einige Zeit später konnte Serum durch die Zugabe von *bone morphogenetic protein 4* (Bmp4) ersetzt werden. Keimbahn-kompetente ES-Zellen konnten dadurch unter definierten Bedingungen mit Hilfe der beiden Zytokine LIF und Bmp4 vermehrt werden (Ying et al. 2003). Selbst unter diesen Bedingungen war es jedoch nicht möglich, Keimbahn-kompetente ES-Zellen aus den Mäusen, die nicht zum 129 Stamm gehören, zu gewinnen. Die beiden erwähnten Zytokine entfalten ihre Wirkung durch Aktivierung von Signalwegen, die die Differenzierung unterdrücken (Niwa et al. 1998; Ying et al. 2003). Ein neuartiger Ansatz, bei dem anstatt der Verwendung von Zytokinen bestimmte Kinasen inhibiert werden, ermöglichte letztendlich die Gewinnung embryonaler Stammzellen aus jedem beliebigen Mäusestamm und folglich eine effiziente Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes von ES-Zellen *in vitro*. Diese neue ES-Zellkultur-Methode, die als „2i“ (steht für die beiden verwendeten Inhibitoren) bezeichnet wird, funktioniert über die Inhibierung des ERK Signalweges und der *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) (Ying et al. 2008; Li und Ding 2010). Durch die Inhibierung des ERK Signalweges wird die Differenzierung der murinen ES-Zellen unterdrückt. Die Inhibierung von GSK3, ein Zwischenglied des WNT Signalweges, erhöht den  $\beta$ -Catenin Spiegel und stellt damit die Proliferation und Selbsterneuerung der Zellen sicher (Wray et al. 2010). Untersuchungen zeigen eine heterogene Expression von Pluripotenzmarker in ES-Zellen, die mit Serum und LIF kultiviert wurden. Dies deutet auf ein unterschiedliches Differenzierungsstadium der Stammzellen innerhalb einer Population hin. Im Gegensatz dazu werden diese Marker in, unter 2i Bedingungen, kultivierten Zellen stark und homogen innerhalb



der ES-Zellkolonien exprimiert (Leitch et al. 2010; Wray et al. 2010). Darüber hinaus können ES-Zellkulturen unter 2i Bedingungen in den Grundzustand der Pluripotenz zurückversetzt werden. Des Weiteren ist zu erwarten, dass die Verwendung einer homogenen ES-Zellkultur unter definierten Kulturbedingungen die Reproduzierbarkeit von Differenzierungsversuchen enorm steigern würde.

Als nächsten Schritt nach der Etablierung definierter Kulturbedingungen erscheint eine genaue zeitliche Auflösung des Expressionsmusters der bisher bekannten endothelialen Marker (SCL; C-Kit; Tie-1; Tie-2; Id1; EphB2 und EphB4; CD31; VE-Cadherin) notwendig. Dank dieser Aufschlüsselung sollte eine durch die Gabe geeigneter Zytokine zu bestimmten Zeitpunkten höhere Differenzierungseffizienz ermöglicht werden.

Mit der Etablierung der hier beschriebenen Zelllinien wurde ein weiteres Instrument geschaffen, das für die Erforschung der Differenzierung embryonaler Stammzellen, sowie für Studien zell-basierter Therapien in Tiermodellen genutzt werden kann. Um die gewonnen Erkenntnisse der klinischen Anwendung näher zu bringen, erscheint eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf induzierte pluripotente Stammzellen (Yamanaka 2007; Yamanaka und Blau 2010) als plausibel.

# Zusammenfassung

Das Endothel ist für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion von essentieller Bedeutung. Störungen wesentlicher Endothelfunktionen werden unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst. Die endotheliale Dysfunktion wird als ein Schlüsselereignis in der Pathologie der kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck, Diabetes, kongestive Herzinsuffizienz und pulmonale Hypertonie angesehen. Die enorme sozioökonomische Bedeutung dieser Erkrankungen ist unumstritten. In der Vergangenheit wurden deshalb viele medikamentöse sowie chirurgische Behandlungsmethoden entwickelt, die jedoch besonders bei schweren Erkrankungen keine langfristig zufriedenstellenden Optionen bieten. Neuere Studien haben bewiesen, dass progressive ischämische Funktionsstörungen und Schäden von Organen durch neue therapeutische Strategien, wie die zell-basierte Therapie, verhindert und wieder hergestellt werden können. Diese Ansätze sehen einen Einsatz autologer, aus dem peripheren Blut oder Knochenmark stammender Vorläuferzellen vor. Trotz der in diesem Feld erreichten Fortschritte bleibt eins der noch nicht gelösten Probleme, die schwierige und akkurate Definierung der Vorläuferzellen, ihre Herkunft und Funktion während der Wiederherstellung der Gefäße. Des Weiteren enthält das periphere Blut nur einen geringen Anteil an Vorläuferzellen und die Gewinnung von Knochenmark beruht auf aufwendigen, invasiven Methoden. Embryonale Stammzellen, die sich zu jedem beliebigen Zelltyp entwickeln können, könnten hier als eine Quelle für therapierelevante Zellen dienen. Aus ethischen Gründen und auf Grund der Immunogenität ist die klinische Anwendung der ES-Zellen jedoch schwierig. Durch den Einsatz induzierter pluripotenter Stammzellen können diese Probleme umgangen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Versuch unternommen, eine Methode zu entwickeln, routinemäßig große Mengen von Endothelzellen von murinen embryonalen Stammzellen abzuleiten. Zu Beginn sollten die Zellen unter Verwendung von *magnetic beads* im Zusammenhang mit dem endothelzellspezifischen Oberflächenantigen Flk-1 mechanisch

aufgereinigt werden. Es ist eine einfach anzuwendende Methode, die jedoch trotz dem, bei der Differenzierung erreichten Anteil an Flk-1 positiven Zellen von 40% und auf Grund der schlechten Expandierbarkeit isolierter Zellen, nur einen geringen Durchsatz bot. Die Etablierung rekombinanter ES-Zelllinien, die unter der Kontrolle endothelspezifischer Promotoren Flk-1 bzw. VE-Cadherin ein Reporter- und ein Resistenzgen exprimieren und eine Antibiotikaselektion der Zellen ermöglichen, sollte an dieser Stelle die mit der mechanischen Isolierung verbundenen Probleme beseitigen. Der Gentransfer in ES-Zellen wurde zunächst über die Elektroporation der Vektoren pFlk und pVE-Cad mit anschließender Antibiotikaselektion stabil-transfizierter Klone durchgeführt. Durch die sehr niedrige Effizienz der Transfektion wurde jedoch zur Anwendung einer weiteren Gentransfermethode, der lentiviralen Transduktion, zurückgegriffen. Diese Methode lieferte auf Anhieb positive Ergebnisse bei einer sehr hohen Effizienz und führte zur Etablierung mehrerer unter der Kontrolle des Flk-1 Promoters GFP- und Zeocin-exprimierender ES-Zellklone. Die generierte ES-Zelllinie soll nun eine antibiotikagestützte Isolierung Flk-1 positiver Zellen ermöglichen. Auf Grund der zellspezifischen GFP-Expression eröffnen sich weitere Anwendungsmöglichkeiten dieser Zelllinie, wie z.B. die Optimierung der Differenzierung in Richtung Endothel.

## Summary

Endothelium is of essential importance for the maintenance of vessel function. Endothelial dysfunction is considered as a key event in the pathology of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, coronary artery disease, hypertension, diabetes, congestive heart failure, and pulmonary hypertension. The huge socioeconomic burden of these diseases is indisputable. Up to now, many pharmacological as well as surgical therapeutic approaches have been developed with few long-term satisfactory outcomes, particularly in severe cases. Newer studies have proven that progressive ischemic dysfunction and organ damage can be prevented and restored by new therapeutic strategies like cell-based therapy. These attempts encompass application of autologous progenitor cells derived from peripheral blood or bone marrow. Notwithstanding the proceedings in this field, the accurate definition and origin of progenitor cells and their function during vessel recovery still remain as unsolved issues. Besides, peripheral blood contains only a low fraction of endothelial progenitor cells and extraction of these cells from bone marrow is based on invasive methods. Embryonic stem cells can develop into any functional cell type, and may serve as a source for cell therapy. Nevertheless, because of ethical concerns about and immunogenicity of embryonic stem cells, their clinical use is still controversial. These problems can be avoided by application of induced pluripotent stem cells.

The present work focuses on development of a method to routinely derive large numbers of endothelial cells from differentiating murine embryonic stem cells. At the beginning, the cells were isolated using magnetic beads in connection with the endothelial-specific surface antigen fetal liver kinase-1(Flk-1). Despite the development of as much as 40% Flk-1 positive cells, the isolated cells were hardly expandable, rendering this system as low-throughput and inefficacious. With this idea, transgenic cell lines expressing a reporter and a resistance gene under the control of endothelial-specific promoters such as Flk-1 and VE-Cadherin were established, allowing for antibiotic selection of desired cells as a solution to the problems linked with mechanical isolation. Gene transfer in

embryonic stem cells was carried out by electroporation of pFlk and pVE-Cad vectors, followed by antibiotic selection of stably transfected clones. Due to the high efficiency of lentiviral transduction, this strategy was later adopted as the alternative approach for gene transfer. Taking advantage of this approach yielded robustly positive results with a very high efficiency, leading to the establishment of several embryonic stem cell clones, expressing GFP and zeocin under the control of the Flk-1 promoter. The generated embryonic stem cell line will later allow for the antibiotic-supported isolation of Flk-1 positive cells. In addition, the cell-specific GFP expression in these cell lines, will also be useful for other applications such as enhancement of differentiation towards endothelial cells, as well as developmental studies.

# Literaturverzeichnis

- Amit, M., C. Shariki et al. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 70(3):837–845.
- Arbel, G., O. Caspi et al. (2010). Methods for human embryonic stem cells derived cardiomyocytes cultivation, genetic manipulation, and transplantation. *Methods Mol Biol*, 660:85–95.
- Armstrong, L., M. Lako et al. (2000). mtert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech Dev*, 97(1-2):109–116.
- Asahara, T., T. Murohara et al. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302):964–967.
- Blancas, A. A., N. E. Lauer und K. E. McCloskey (2008). Endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, Chapter 1:Unit 1F.5. PMID: 18819086.
- Boheler, K. R., J. Czyz et al. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*, 91(3):189–201.
- Boilson, B. A., T. J. Kiernan et al. (2008). Circulating CD34+ cell subsets in patients with coronary endothelial dysfunction. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, 5(8):489–496. PMID: 18578002.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman und A. Lerman (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2):168–175. PMID: 12588755.
- Bradley, A., M. Evans et al. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965):255–256.
- Breier, G., F. Breviario et al. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, 87(2):630–641.

- Burdon, T., I. Chambers et al. (1999). Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, 165(3-4):131–143.
- Burns, J. C., T. Friedmann et al. (1993). Vesicular stomatitis virus g glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17):8033–8037.
- Carmeliet, P., V. Ferreira et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vegf allele. *Nature*, 380(6573):435–439.
- Chambers, I., D. Colby et al. (2003). Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5):643–655.
- Choi, K., M. Kennedy et al. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development (Cambridge, England)*, 125(4):725–732. PMID: 9435292.
- Chung, S., T. Andersson et al. (2002). Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 20(2):139–145.
- Conley, B. J., J. C. Young et al. (2004). Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4):555–567.
- Dang, S. M., S. Gerecht-Nir et al. (2004). Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells*, 22(3):275–282.
- Davis, H. E., M. Rosinski et al. (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J*, 86(2):1234–1242.
- De Palma, M., M. A. Venneri und L. Naldini (2003). In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 14(12):1193–1206.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter et al. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 87:27–45.
- Ema, M., P. Faloony et al. (2003). Combinatorial effects of flk1 and tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev*, 17(3):380–393.
- Ema, M., S. Takahashi und J. Rossant (2006). Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted flk1-lacZ allele reveals flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood*, 107(1):111–117.

- Escors, D. und K. Breckpot (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 58(2):107–119.
- Evans, M. J. und M. H. Kaufman (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154–156.
- Fan, Y., F. Shen et al. (2010). Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Annals of Neurology*, 67(4):488–497. PMID: 20437584.
- Felder III, J. M. und R. E. Sutton, Lentiviral vectors. In N. S. Templeton, Herausgeber, *Gene and Cell Therapy*, Seiten 207–243 (CRC Press, 2009), 3 Auflage.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore et al. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the vegf gene. *Nature*, 380(6573):439–442.
- Fina, L., H. V. Molgaard et al. (1990). Expression of the cd34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75(12):2417–2426.
- Follenzi, A., L. E. Ailles et al. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by hiv-1 pol sequences. *Nat Genet*, 25(2):217–222.
- Gadue, P., T. L. Huber et al. (2006). Wnt and tgf-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(45):16806–16811.
- Geft, D., S. Schwartzberg et al. (2008). Circulating apoptotic progenitor cells in patients with congestive heart failure. *PloS One*, 3(9):e3238. PMID: 18800166.
- Gimond, C., S. Marchetti und G. Pagès (2006). Differentiation of mouse embryonic stem cells into endothelial cells: genetic selection and potential use in vivo. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 330:303–329.
- Goff, S. P., *Fields Virology*, Kapitel 55 - Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication, Seiten 2001–2069 (Lippincott Williams & Wilkins, 2007), 5 Auflage.
- Gory, S., M. Vernet et al. (1999). The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*, 93(1):184–192.
- Graham, F. L., J. Smiley et al. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1):59–74. PMID: 886304.
- Hayward, W. S., B. G. Neel und S. M. Astrin (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in alv-induced lymphoid leukemia. *Nature*, 290(5806):475–480.



- Heitzer, T., T. Schlinzig et al. (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104(22):2673–2678. PMID: 11723017.
- Holst, J., K. M. Vignali et al. (2006). Rapid analysis of t-cell selection in vivo using t cell-receptor retrogenic mice. *Nat Methods*, 3(3):191–197.
- Hong, S., D.-Y. Hwang et al. (2007). Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol Ther*, 15(9):1630–1639.
- Ingram, D. A., N. M. Caplice und M. C. Yoder (2005). Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*, 106(5):1525–1531. PMID: 15905185.
- Jackson, R. J., M. T. Howell und A. Kaminski (1990). The novel mechanism of initiation of picornavirus rna translation. *Trends Biochem Sci*, 15(12):477–483.
- Jang, S. K., T. V. Pestova et al. (1990). Cap-independent translation of picornavirus rnas: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme*, 44(1-4):292–309.
- Jezierski, A., A. Swedani und L. Wang (2007). Development of hematopoietic and endothelial cells from human embryonic stem cells: lessons from the studies using mouse as a model. *TheScientificWorldJournal*, 7:1950–1964.
- Jähner, D. und R. Jaenisch (1985). Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature*, 315(6020):594–597.
- Jähner, D., H. Stuhlmann et al. (1982). De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature*, 298(5875):623–628.
- Kalka, C., H. Masuda et al. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7):3422–3427. PMID: 10725398.
- Kappel, A., V. Röncke et al. (1999). Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood*, 93(12):4284–4292.
- Kattman, S. J., T. L. Huber und G. M. Keller (2006). Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*, 11(5):723–732.

- Kattman, S. J., A. D. Witty et al. (2011). Stage-specific optimization of activin/nodal and bmp signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*, 8(2):228–240.
- Kaufman, M. H., E. J. Robertson et al. (1983). Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 73:249–261.
- Kawamoto, A. und T. Asahara (2007). Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheterization and Cardiovascular Interventions: Official Journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 70(4):477–484. PMID: 17894361.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & development*, 19(10):1129–1155.
- Kelm, M. und B. E. Strauer (1999). Endotheliale dysfunktion therapeutische und prognostische relevanz. *Der Internist*, 40(12):1300–1307.
- Kennedy, M., M. Firpo et al. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*, 386(6624):488–493.
- Kerem, A., J. Yin et al. (2010). Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired ca2+ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circulation Research*, 106(6):1103–1116. PMID: 20167930.
- Kim, S., G. J. Kim et al. (2007). Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. *Stem Cells Dev*, 16(4):537–545.
- Klug, M. G., M. H. Soonpaa et al. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *The Journal of clinical investigation*, 98(1):216–224.
- Kobayakawa, S., K. Miike et al. (2007). Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes Cells*, 12(4):447–460.
- Kobayashi, N., J. D. Rivas-Carrillo et al. (2005). Gene delivery to embryonic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 75(1):10–18.
- Kouskoff, V., G. Lacaud et al. (2005). Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37):13170–13175.

- Le Grand, F., G. Auda-Boucher et al. (2004). Endothelial cells within embryonic skeletal muscles: a potential source of myogenic progenitors. *Exp Cell Res*, 301(2):232–241.
- Leitch, H. G., K. Blair et al. (2010). Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development*, 137(14):2279–2287.
- Levenberg, S., L. S. Ferreira et al. (2010). Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nature Protocols*, 5(6):1115–1126. PMID: 20539287.
- Li, M., L. Pevny et al. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol*, 8(17):971–974.
- Li, W. und S. Ding (2010). Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci*, 31(1):36–45.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917):868–874. PMID: 12490960.
- Liu, B. H., X. Wang et al. (2004). Cmv enhancer/human pdgf-beta promoter for neuron-specific transgene expression. *Gene Ther*, 11(1):52–60.
- Lloyd-Jones, D., R. Adams et al. (2009). Heart disease and stroke statistics–2009 update: a report from the american heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation*, 119(3):480–486. PMID: 19171871.
- Marchetti, S., C. Gimond et al. (2002). Endothelial cells genetically selected from differentiating mouse embryonic stem cells incorporate at sites of neovascularization in vivo. *J Cell Sci*, 115(Pt 10):2075–2085.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12):7634–7638.
- McCloskey, K. E., I. Lyons et al. (2004). Purified and proliferating endothelial cells derived and expanded in vitro from embryonic stem cells. *Endothelium : journal of endothelial cell research*, 10(6):329–336.
- McCloskey, K. E., S. L. Stice und R. M. Nerem (2006). In vitro derivation and expansion of endothelial cells from embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 330:287–301.

- Miraglia, S., W. Godfrey et al. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90(12):5013–5021. PMID: 9389721.
- Mitchell, R. S., B. F. Beitzel et al. (2004). Retroviral dna integration: Aslv, hiv, and mlv show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, 2(8):E234.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa et al. (2003). The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and es cells. *Cell*, 113(5):631–642.
- Miyoshi, H., U. Blömer et al. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*, 72(10):8150–8157.
- Motoike, T., D. W. Markham et al. (2003). Evidence for novel fate of flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. *Genesis*, 35(3):153–159.
- Murry, C. E. und G. Keller (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 132(4):661–680.
- Naldini, L., U. Blömer et al. (1996a). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21):11382–11388.
- Naldini, L., U. Blömer et al. (1996b). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259):263–267.
- Newman, P. J., M. C. Berndt et al. (1990). Pecam-1 (cd31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247(4947):1219–1222.
- Nichols, J., B. Zevnik et al. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the pou transcription factor oct4. *Cell*, 95(3):379–391.
- Nishikawa, S. I., S. Nishikawa et al. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 125(9):1747–1757.
- Niwa, H., T. Burdon et al. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of stat3. *Genes Dev*, 12(13):2048–2060.
- Niwa, H., J. Miyazaki und A. G. Smith (2000). Quantitative expression of oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of es cells. *Nat Genet*, 24(4):372–376.

- Patterson, C., M. A. Perrella et al. (1995). Cloning and functional analysis of the promoter for kdr/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 270(39):23111–23118.
- Pesce, M., K. Anastassiadis und H. R. Schöler (1999). Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, 165(3-4):144–152.
- Poznansky, M., A. Lever et al. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol*, 65(1):532–536.
- Qi, X., T.-G. Li et al. (2004). Bmp4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16):6027–6032.
- Quirici, N., D. Soligo et al. (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *British Journal of Haematology*, 115(1):186–194. PMID: 11722432.
- Rafii, S. und D. Lyden (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Medicine*, 9(6):702–712. PMID: 12778169.
- Rathjen, P. D., J. Nichols et al. (1990). Developmentally programmed induction of differentiation inhibiting activity and the control of stem cell populations. *Genes Dev*, 4(12B):2308–2318.
- Reicin, A. S., G. Kalpana et al. (1995). Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 u3 region required for in vivo and in vitro integration. *J Virol*, 69(9):5904–5907.
- Risau, W. (1995). Differentiation of endothelium. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(10):926–933.
- Rosenberg, N. und P. Jolicoeur, *Retroviruses*, Kapitel 10 - Retroviral pathogenesis, Seite 475–585 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 1997).
- Ross, R., D. Bowen-Pope et al. (1982). Endothelial injury: blood-vessel wall interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 401:260–264. PMID: 6963124.
- Rönicke, V., W. Risau und G. Breier (1996). Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter. *Circulation Research*, 79(2):277–285. PMID: 8756005.
- Sakao, S., K. Tatsumi und N. F. Voelkel (2009). Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respiratory Research*, 10:95. PMID: 19825167.

- Saraiva, N. Z., C. S. Oliveira und J. M. Garcia (2010). Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation. *World J Stem Cells*, 2(6):121–126.
- Schambach, A., T. Maetzig und C. Baum, Retroviral vectors for cell and gene therapy. In N. S. Templeton, Herausgeber, *Gene and Cell Therapy*, Kapitel 1, Seiten 3–15 (CRC Press, 2009), 3 Auflage. ISBN 978-0-8493-8768-5.
- Schoonjans, L., V. Kreemers et al. (2003). Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells*, 21(1):90–97.
- Schröder, A. R. W., P. Shinn et al. (2002). Hiv-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4):521–529.
- Schwenter, F., N. Déglon und P. Aebischer (2003). Optimization of human erythropoietin secretion from mlv-infected human primary fibroblasts used for encapsulated cell therapy. *J Gene Med*, 5(3):246–257.
- Schöler, H. R., A. K. Hatzopoulos et al. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an oct factor. *EMBO J*, 8(9):2543–2550.
- Seitz, B., E. Baktanian et al. (1998). Retroviral vector-mediated gene transfer into keratocytes: in vitro effects of polybrene and protamine sulfate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 236(8):602–612.
- Semenza, G. L. (1999). Regulation of mammalian o<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15:551–578.
- Shalaby, F., J. Rossant et al. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535):62–66.
- Shi, Q., S. Rafii et al. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92(2):362–367. PMID: 9657732.
- Silva, J., O. Barrandon et al. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*, 6(10):e253.
- Sinha, S., M. H. Hoofnagle und G. K. Owens (2009). Derivation of contractile smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 482:345–367.
- Sinha, S., B. R. Wamhoff et al. (2006). Assessment of contractility of purified smooth muscle cells derived from embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(7):1678–1688.

- Smith, A., *Stem cell biology*, Kapitel Embryonic stem cells, Seiten 205–230 (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001a).
- Smith, A. G. (1991). Culture and differentiation of embryonic stem cells. *Journal of Tissue Culture Methods*, 13(2):89–94.
- Smith, A. G. (2001b). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:435–462.
- Smith, A. G., J. K. Heath et al. (1988). Inhibition of pluripotent embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336(6200):688–690.
- Solter, D. und B. B. Knowles (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (ssea-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(11):5565–5569.
- Solway, J., J. Seltzer et al. (1995). Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *The Journal of biological chemistry*, 270(22):13460–13469.
- Sone, M., H. Itoh et al. (2007). Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(10):2127–2134.
- Sumpio, B. E., J. T. Riley und A. Dardik (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(12):1508–1512. PMID: 12379270.
- Szymczak, A. L., C. J. Workman et al. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2a peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol*, 22(5):589–594.
- Tabit, C. E., W. B. Chung et al. (2010). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 11(1):61–74. PMID: 20186491.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7(5):619–627.
- Taylor, A. A. (2001). Pathophysiology of hypertension and endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(4):983–997. PMID: 11727407.
- Tompers, D. M. und P. A. Labosky (2004). Electroporation of murine embryonic stem cells: a step-by-step guide. *Stem Cells*, 22(3):243–249.

- Tremml, G., M. Singer und R. Malavarca (2008). Culture of mouse embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 1:Unit 1C.4.
- Urbich, C. und S. Dimmeler (2004). Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(8):318–322. PMID: 15596109.
- Valgimigli, M., G. M. Rigolin et al. (2004). CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*, 110(10):1209–1212. PMID: 15249502.
- Vecchi, A., C. Garlanda et al. (1994). Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol*, 63(2):247–254.
- Versari, D., E. Daghini et al. (2009). Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 157(4):527–536. PMID: 19630832.
- Vittet, D., M. H. Prandini et al. (1996). Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*, 88(9):3424–3431.
- Vodyanik, M. A., J. A. Thomson und I. I. Slukvin (2006). Leukosialin (cd43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood*, 108(6):2095–2105.
- Wang, L., L. Li et al. (2004). Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*, 21(1):31–41.
- Ward, C. M. und P. L. Stern (2002). The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 20(5):472–475.
- Werner, N., S. Kosiol et al. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England Journal of Medicine*, 353(10):999–1007. PMID: 16148285.
- White, S. L. und R. B. Low (1996). Identification of promoter elements involved in cell-specific regulation of rat smooth muscle myosin heavy chain gene transcription. *The Journal of biological chemistry*, 271(25):15008–15017.
- Wiles, M. V. und B. M. Johansson (1999). Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res*, 247(1):241–248.



- Wiles, M. V. und G. Keller (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (es) cells in culture. *Development*, 111(2):259–267.
- Williams, R. L., D. J. Hilton et al. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336(6200):684–687.
- Wobus, A. M. und K. R. Boheler (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*, 85(2):635–678.
- Wobus, A. M., K. Guan et al. (2002). Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol*, 185:127–156.
- Wobus, A. M., H. Holzhausen et al. (1984). Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res*, 152(1):212–219.
- Wong, W. T., S. L. Wong et al. (2010). Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 55(4):300–307. PMID: 20422734.
- Wray, J., T. Kalkan und A. G. Smith (2010). The ground state of pluripotency. *Biochem Soc Trans*, 38(4):1027–1032.
- Yamahara, K., M. Sone et al. (2008). Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS ONE*, 3(2):e1666.
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 1(1):39–49. PMID: 18371333.
- Yamanaka, S. und H. M. Blau (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465(7299):704–712. PMID: 20535199.
- Yamashita, J., H. Itoh et al. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 408(6808):92–96.
- Yang, Y., E. F. Vanin et al. (1995). Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus g envelope protein. *Hum Gene Ther*, 6(9):1203–1213.
- Ying, Q. L., J. Nichols et al. (2003). Bmp induction of id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with stat3. *Cell*, 115(3):281–292.

- Ying, Q.-L., J. Wray et al. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194):519–523.
- Yurugi-Kobayashi, T., H. Itoh et al. (2003). Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood*, 101(7):2675–2678. PMID: 12480710.
- Zandstra, P. W., C. Bauwens et al. (2003). Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng*, 9(4):767–778.
- Zeng, X., J. Chen et al. (2003). Stable expression of hrgfp by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells*, 21(6):647–653.
- Zennou, V., C. Petit et al. (2000). Hiv-1 genome nuclear import is mediated by a central dna flap. *Cell*, 101(2):173–185.
- Zhao, X., Y. Ruan und C.-L. Wei (2008). Tackling the epigenome in the pluripotent stem cells. *J Genet Genomics*, 35(7):403–412.
- Zufferey, R., T. Dull et al. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72(12):9873–9880.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Stammzellhierarchie . . . . .	4
1.2	Regulation der Selbserneuerung in murinen ES-Zellen . . . . .	6
1.3	Entwicklungsmodell muriner mesodermaler Zellen . . . . .	9
1.4	Schematische Darstellung des Lebenszyklus eines lentiviralen Vektors . . . . .	12
2.1	pMHC Vektor . . . . .	21
2.2	pFlk Vektor . . . . .	22
2.3	pVE-Cad Vektor . . . . .	22
2.4	pcDNA-PGK-EGFP Vektor . . . . .	23
2.5	pGZ-CMV Vektor . . . . .	24
2.6	pGZ-Flk Vektor . . . . .	25
2.7	pMD2.G Vektor . . . . .	25
2.8	psPAX2 Vektor . . . . .	26
2.9	Beispiel eines Oligonukleotides für die Amplifikation eines <i>inserts</i> . . . . .	29
2.10	Differenzierungsprozedur . . . . .	40
3.1	Analyse der Differenzierung . . . . .	49
3.2	Vordifferenzierung . . . . .	50
3.3	Vordifferenzierung mit und ohne <i>feeder</i> -Zellen . . . . .	51
3.4	Isolierte Flk-1 positive Zellen . . . . .	52
3.5	Fluoreszenzfärbung isolierter Flk-1 positiver Zellen . . . . .	52
3.6	Mit pcDNA PGK-GFP stabil transfizierte ES-Zellen . . . . .	54
3.7	Flk screen . . . . .	55
3.8	VE-Cad screen . . . . .	56
3.9	FACS screen . . . . .	57
3.10	Immunfluoreszenzfärbung des E14Flk Klons Nr. 45 . . . . .	58
3.11	Mit pGZ-Flk Konstrukt enthaltenden viralen Partikeln infizierte Endotheliomazellen und MEF . . . . .	59
3.12	Visueller Screen. . . . .	60
3.13	GFP-expimierende vaskuläre Strukturen. . . . .	61
3.14	Klon 1H3 . . . . .	62

# Abkürzungsverzeichnis

BPM4	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	fötales Kälberserum
Flk-1	<i>fetal liver kinase-1</i>
GSK-3	<i>glycogen syntase kinase-3</i>
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rPASC	<i>rat pulmonary artery smooth muscle cells</i>
SIN-Vektor	<i>self inactivating vector</i>
SMMHC	<i>smooth muscle myosine heavy chain</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus-glucoprotein</i>
WB	Western Blot

# Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Seeger für die mir eingeräumte Möglichkeit in seiner Abteilung diese Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihm für sein ernsthaftes Interesse an diesem Projekt und sein Engagement.

Dem Herrn Prof. Dr. Clauss danke ich für die Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich der Biologie, für seine ehrliche Hilfsbereitschaft und für seine Zeit.

Herrn Prof. Dr. Sauer danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor in die Welt der Stammzellen einzutauchen.

Ich möchte dem Herrn Dr. Voswinckel, dem unmittelbaren Betreuer dieses Projektes, für sein Vertrauen danken und für die unbegrenzte Möglichkeit, in seinem Labor eigene Entscheidungen zu treffen.

Für ihre Freundschaft und Anerkennung danke ich den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und der AG vom Prof. Dr. Schermuly. Besonders möchte ich dabei Kirsten Szelepusa für ihre Anteilnahme, die vielen Gespräche und aufbauende Worte, Wiebke Janssen für ihre am gründlichsten durchgeführte Korrektur dieser Arbeit, Jens-Christian Wolff für die Starthilfe beim Klonieren danken.

Meinem Freund Christian Melaun danke ich für die begleitende Hilfe beim Zusammenfassen dieser Arbeit. Es ist gut, jemanden zu haben, der dir ab und zu über die Schulter schaut und sagt, dass nicht alles, was du da fabrizierst, völliger Unsinn ist. Danke Christian, dass Du für mich da warst.

In Bewunderung und Schätzung ihrer unermesslichen Geduld gilt mein ganz besonderer Dank meiner geliebten Frau, die mir eine Familie gegeben hat, ohne die das alles hier keinen Sinn hätte.

Ich danke meinen Eltern und meinen Schwestern Inga und Anna für ihre Anteilnahme und ihre Sorgen um mich. Meinem Vater danke ich für sein unerschütterliches Glauben an mich und seine beharrliche Unterstützung und meiner Mama danke ich für ihr Bemühen die Beharrlichkeit dieser Unterstützung abzumildern.

# Erklärung der Selbstständigkeit

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Solms, den 23. August 2011

Sven Becker

# Anhang

## Verwendete Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Länge</i>	<i>Sequenz</i>
A_Flk-enhan	20	ctgcgttgccaacttcaagg
A_Flk-prom	20	gctgcactgaaagtccaag
A_I-GFP	20	gtcgctacagacgttgtttg
AP F-neo screen	23	cctgcgtgcaatccatcttgttc
AP Fe-PGK screen	22	tgctaaagcgcgatgctccagac
AP Flk enhancer	27	taccgggggtccaataggaaagccctt
AP GFP-Fe screen	22	aaagggacgggagccactgtga
AP IRES-EGFP	39	cattaaagagctctttactgtacagctcgtccatgccg
AP neo-IRES scre	20	ggtttccgggccctcacatt
AP SMMHC	25	ctatcttaaggctcggatctggcac
AP-FGTNF-XhoI_n	31	ttcctctcgagcggggtccaataggaaagcc
AP-Flk-NheI	36	gtggccgctagcgcctgcacctcgcgctgggcacag
AP-Flk-scr	20	aacacggcggcatcagagca
AP-GE-scr	21	tgaaagggacgggagccactg
AP-GP-scr	21	ggaaaagcgcctcccctaccc
AP-GTN-XhoI-n	31	gtcgactcgagcgaacaacgacccaacacc
AP-PGK-BspTI	31	ctatacttaagggtggcgggatgcaggtcga
AP-PGK-GFP-scr	20	tttacgtcgccgtccagctc
AP-PGK-NheI	31	gggatgctagccgaaaggcccggagatgagg
AP-scrWPRE	20	agtgcacaccagccacgtt
AP-SM22-scr	20	gaacacggcggcatcagagc
AP-T2A	63	ttccttcggcgccgctcggacgactggacgccgctacaccttctttgggcccgggcccgcgg
AP-T2A-screen	20	ttccacatcgccgcaggtca
AP-VE+MHC-scr	20	ggcacgggacaggtcgtct

weiter auf der nächsten Seite

### Verwendete Oligonukleotide

<b>Name</b>	<b>Länge</b>	<b>Sequenz</b>
AP_F-copG-scr	20	catggtggcggatccgattt
AP_F-neo_scr_hTm	29	ccggagaacctgcgtgcaatccatcttgt
AP_FGTNF-Xhol	31	ctatactcgagcgggggtccaataggaaagcc
AP_GTN-Xhol	33	ctatactcgagcgaacaaacgacccaacacccg
AP_IGFP_SacI	29	gtatagagctcggacaaaccacaactaga
AP_IGFP_SacI_hTm	36	gtatagagctcgagtttgacaaaccacaactagaa
AP_neo_Sall	29	gtatagtcgacatcccctcagaagaactc
AP_neo_Sall_hTm	33	gtatagtcgacgccgatcccctcagaagaactc
AP_SM22	31	ctatacttaagtagcttcggtgtctgggctg
AP_SMMHC#1	33	ctatacttaaggagctcggatctggcactgatc
AP_WPRE	25	cacagtgcacaccacgccacgttgc
AS Flk promoter	28	gtatacttaagcctgcacctcgcgctgg
AS_Sall-link	27	tcgaacccggggaggttgattgtcgag
ASP_GFP_NotI	27	gagtcgcgccgctttaaccttgtaca
ASP_VE-Cad	36	ctatacttaagagtctgtccagggccgagctttgtg
FP_VE-Cad_screen	20	agggcttgcttatctgcagg
RP_VE-Cad_sreen	20	gttgtgcccagtcatagccg
S_Flk-enhanc_#1	20	ctgttgtgttggtttgtgac
S_Flk-prom_#1	20	ggtgatgcttcccaggttgc
S_Flk-prom_#2	22	gataacctggctgacccgattc
S_IGFP_#1	24	gccacgtgtataagatacacctgc
S_IGFP_#2	21	gacgtaaacggccacaagttc
S_IGFP_#3	22	gcacaagctggagtacaactac
S_Sall-link	27	tcgactcgacaatcaacctccccgggt
SM22-2735_01	22	gctcgtatgttgtgtggaattg
SM22-2735_02	19	aacgggtccaagcacacag
SM22-2735_03	20	cgggtctgggtctttgtttc
SM22-2735_04	20	agatgggtgtccaggctgtg
SM22-2735_05	18	cccttccttcagatcca
SM22-2735_06	20	cctgagcctgtctcacctgt
SM22-2735_07	19	cgtttgcatagtgcctgtg

weiter auf der nächsten Seite



### Verwendete Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Länge</i>	<i>Sequenz</i>
SM22-2735_08	20	agacttccatgggcagggag
SM22-455_1	19	gcttccggctcgtatgttg
SM22-455_2	20	agagaatgtctccggctgcc
SMMHC_1	22	ggctcgtatgtgtgtgaatt
SMMHC_2	18	gaggcgtccccggctctgg
SMMHC_3	24	cttttcaacgatgttcagagaaac
SMMHC_4	22	cttttctgtaaggaccaggat
SP EGFP-Fe scree	22	tgctgctgcccgacaaccacta
SP F-neo screen	22	gggataacctggctgaccgat
SP Fe-PGK screen	22	gccgtgaattgcagagctgttg
SP Flk enhancer	31	tcgagctctaaatgtgctgtctttagaagcc
SP Flk promoter	30	catatctcgagcgaccagccaggaagttc
SP IRES-EGFP	26	agctcaagcttcgaattctgcagtcg
SP neo-IRES scree	22	aggacatagcgttggtacctcg
SP SMMHC	28	catagtcgacacaggactcagctctctg
SP-FGTNF-Mlul_n	31	attccacgcgtcgaccagccaggaagttca
SP-Flk-ClaI	35	gaattccatcgatcgaccagccaggaagttcaca
SP-Flk-scr	20	ggcgcataccgcctctgtga
SP-GE-scr	20	cgggatcactctcggcatgg
SP-GP-scr	20	cccaacgagaagcgcatca
SP-GTN-BamHI-n	31	ggcctggatccccacaaccatggtgagcaag
SP-pcDNA-Flk	20	aaggcaaggcttgaccgaca
SP-PGK-ClaI	31	tcgagatcgattaccgggtaggggagcgct
SP-PGK-GFP-scr	20	ttcagaggctgggaaggggt
SP-PGK-Mlul	32	gtataacgcgttaccgggtaggggagggcgctt
SP-SM22-scr	20	gctgccccgacagactgct
SP-SMMHC-scr	20	cgccgcgaagggaagaggat
SP-T2A	63	gtacaaggaaggccgcgagcctgctgacctgcggcgatgtggaagaaaacccgggcccgcc
SP-VE-scr	20	ggccagggccagttggaaaa
SP_F-neo_scr_hTm	29	agctgtgtttccttagatcgcgcgaccg
SP_FGTNF-Mlul	31	gatatacgcgtcgaccagccaggaagttca

weiter auf der nächsten Seite

### Verwendete Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Länge</i>	<i>Sequenz</i>
SP_GFP_BspTI	36	gtatacttaagggccacaacccatggtgagcaagggc
SP_GTN-BamHI	33	ctataggatccccacaacccatggtgagcaaggg
SP_IRES-seq	18	gtttgttcggatccgtcg
SP_Neo-seq#1	18	agcgaccctgcagccaat
SP_Neo-seq#2	18	tgctattgggcgaagtgc
SP_Neo-seq#3	19	tgcttgccgaatatcatgg
SP_neo_BspTI	18	tgcaggccttaaggcggc
SP_PGK-Hygro#1	20	ttcctattggacccgggct
SP_PGK-Hygro#2	20	agcaatggaagcgggtaggc
SP_PGK-Hygro#3	20	acagcgtctccgacctgatg
SP_PGK-Hygro#4	18	atggatgcgatcgctgcg
SP_PGK-Hygro#5	18	cggggattcccaatacga
SP_PGK-Hygro#6	23	tgtgtagaagtactcgccgatag
SP_SM22-2735	31	gtatactcgaggcaggtaggagactttgggg
SP_SM22-455	34	gtatactcgagctgcagtcaagactagttccac
SP_SMMHC#1	34	gtatagtcgactcacaggactcagtcttctggcc
SP_VE-Cad	36	gtatactcgagcatgcagtgcaggaggagccagaa
SqASP_pSM22	20	tcaccagaactggctgcag
SqASP_pSMMHC	22	gggaaaagaaagggaacttgt
SqP_IGFP	23	cgccttcttgacgagttcttctg
SqP_pSMMHC_5	25	ggagagagagagagagagagagaaa
SqP_pVE-Cad_01	22	cgtatgttgtgtggaattgtga
SqP_pVE-Cad_02	20	gtttcctgtcttctggcag
SqP_pVE-Cad_03	21	acagaacagattgtggcagag
SqP_pVE-Cad_04	20	aggacaagttggggacttcc
SqP_pVE-Cad_05	21	cccatcaccagttattgtaa
SqP_pVE-Cad_06	20	tatctgcaggcagctcaca